

SUMARIO

1 a 20 - Las proteínas de soja permiten controlar la digestión de lípidos emulsionados como una potencial estrategia para contribuir a la disminución de las enfermedades no transmisibles: utilidad de modelos in vitro

Bellesi, Fernando A^{1,2}, Naso Julieta N^{1,3}, Pizones Ruiz-Henestrosa Víctor M^{1,2}, Pilosof Ana M R^{1,2}

¹ ITAPROQ- Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

³ Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Argentina.

Correspondencia: fernandobellesi@gmail.com; julietannaso@gmail.com; vicprh@gmail.com; pilosofana@gmail.com

21 a 40 - El caseinomacropéptido tiene potencial para prevenir la deficiencia de calcio

Loria, Karina Gabriela^{*1,2} y Farías, María Edith^{*1,3}

¹ Universidad Nacional de Luján. Departamento de Tecnología. Ruta 5 y Avenida 9 Constitución - (6700) Luján, Buenos Aires, Argentina. 10

² Becaria posdoctoral Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas 11 (CONICET).

³ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 13 Departamento de Industrias. Ciudad Universitaria. Buenos Aires (1428), Argentina.

Correspondencia: Email: efarias@mail.unlu.edu.ar

41 a 60 - Aspectos funcionales y nutricionales de harinas comerciales orgánicas de trigos ancestrales (triticum spelta) y trigo pan (triticum aestivum L.) en argentina

Ormando, P.^{3,4,5}; Mir, L.²; Di Pane, F.¹; Molfese, E.¹

¹ Chacra Experimental Integrada Barrow. Grupo Mejoramiento y Calidad (Convenio MDA-INTA) C.C.50-7500 - Tres Arroyos, Pcia. Buenos Aires, Argentina.

² Estación Experimental A. EEA, Marcos Juárez. Córdoba, Argentina.

³ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto Tecnología de Alimentos. Argentina.

⁴ Instituto de Ciencia y Tecnología de Sistemas Alimentarios Sustentables, UEDD INTA CONICET. Argentina.

⁵ Universidad Argentina de la Empresa (UADE). Instituto de Tecnología (INTEC). Buenos Aires, Argentina.

Correspondencia: molfese.elenarosa@inta.gob.ar

61 a 79 - Microencapsulación de aceite de chia y desarrollo de alimentos enriquecidos en omega-3

Agustín González^{1,2,3}, María G. Bordón^{1,4}, Pablo D. Ribotta^{1,4*} y Marcela L. Martínez^{1,5}

¹ Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA - FCEPyN - UNC). Córdoba, Argentina.

² Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Materiales Poliméricos (LaMaP). Córdoba, Argentina.

³ Instituto de Investigaciones y Desarrollo en Ingeniería de Procesos y Química Aplicada (IPQA - CONICET - UNC). Córdoba, Argentina.

⁴ Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba (ICYTAC - CONICET - UNC). Córdoba, Argentina. ⁵ Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV - CONICET - UNC). Córdoba, Argentina.

Correspondencia: pdribotta@unc.edu.ar

La Revista del Foro de la Alimentación, Nutrición y Salud (RFANUS) pretende contribuir a la mejora de la salud pública a través de investigaciones y actualizaciones tendientes a un mejor entendimiento de las ciencias relacionadas con la producción primaria y la industrialización de los alimentos con los sectores relacionados a la salud y nutrición pública.

Esta original iniciativa intenta integrar el estudio de las varias disciplinas relacionadas, contemplando los intereses de dichos sectores para converger en una mejor salud y nutrición de la población.

Dado el reconocimiento de la importancia de la alimentación en la salud y la calidad de vida existe una demanda creciente de la transferencia de conocimientos a profesionales de los sectores de la cadena alimentaria y de la salud y nutrición pública.

El objetivo fundamental de la RFANUS es construir una comunicación efectiva entre todos los sectores involucrados en la cadena alimentaria y el sector de la salud y nutrición humana y animal.

Periodicidad: Tres volúmenes anuales: abril, agosto y noviembre

Lectores: La RFANUS estará dedicada a todos los sectores de la cadena alimentaria, desde el productor de la materia prima, los integrantes de su industrialización y comercialización hasta los sectores directa o indirectamente vinculados con la salud.

Temas a cubrir

1. Efecto de los sistemas de producción en los contenidos de los nutrientes mayores, así como de los microelementos y sustancias bioactivas de interés en la nutrición humana y animal.
2. Efecto de la post cosecha en los contenidos y biodisponibilidad de las sustancias bioactivas.
3. Efecto de los procesos industriales en los contenidos y biodisponibilidad de las sustancias bioactivas.
4. Acciones desarrolladas para vincular la cadena alimentaria con la calidad nutricional de los alimentos
5. Efecto de la biodisponibilidad de las sustancias bioactivas en la salud humana.
6. Biodisponibilidad de sustancias bioactivas y microelementos y competitividad de los alimentos.
7. Influencia de los cambios en la calidad nutricional de los alimentos en la comercialización en mercado nacional y mundial.

Cuerpo editorial

Director: Economista Ramiro Guillermo Costa Sub Director Ejecutivo de la Bolsa de Cereales y de FANUS

Comité Editorial: Consejo Directivo de FANUS

Comité Editorial externo:

Dr. Claudio Galmarini. EEA La Consulta Mendoza INTA.

Dra. Marta Cuniberti. EEA Marcos Juárez INTA.

Dr. Guillermo Eyherabide. EEA Pergamino INTA.

Dr. Aníbal Pordomingo. EEA Anguil INTA.

Dra. Roxana Beatriz Páez. EEA Rafaela INTA.

Dra. Noemi Zaritzky. CIDCA. CONICET. CIC.

Lda. Estela Kneeteman. Laboratorio Agroalimentos, Toxicología y Nutrición. INTI.

Dr. Gustavo Polenta. Instituto Tecnología Alimentos. INTA Castelar.

Dra. Paola Finocchietto. Hospital de Clínicas José de San Martín. UBA.

Dra. Laura M. J. Brandani. Facultad de Ciencias Médicas Universidad Favaloro.

Dr. Rubén Daniel Rampa. División Oncología. Hospital Español de Buenos Aires.

Lda. María Inés Somoza. Facultad de Ciencias Médicas Universidad Favaloro.

Información para autores / Proceso editorial de los manuscritos - En <http://fanus.com.ar/rfanus>

LAS PROTEÍNAS DE SOJA PERMITEN CONTROLAR LA DIGESTIÓN DE LÍPIDOS EMULSIONADOS COMO UNA POTENCIAL ESTRATEGIA PARA CONTRIBUIR A LA DISMINUCION DE LAS ENFERMEDADES NO TRANSMISIBLES: UTILIDAD DE MODELOS *IN VITRO*

Bellesi, Fernando A^{1,2}, Naso Julieta N^{1,3}, Pizones Ruiz-Henestrosa Víctor M^{1,2}, Pilosof Ana M R^{1,2}

fernandobellesi@gmail.com; julietannaso@gmail.com; vicprh@gmail.com; pilosofana@gmail.com

1- ITAPROQ- Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina.

2-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

3-Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Argentina.

RESUMEN

Las proteínas de soja (SPI) son proteínas vegetales de importancia comercial por sus propiedades nutricionales y funcionales, entre ellas sus propiedades emulsionantes. Este trabajo proporciona evidencia que estas proteínas cuando se usan como emulsionantes, disminuyen la lipólisis de un aceite emulsionado. Esto permitiría controlar la digestión de lípidos (bioaccesibilidad) constituyendo una estrategia para hacer frente a enfermedades no transmisibles asociadas con la elevada absorción de lípidos como la obesidad y las enfermedades cardiovasculares. El grado de lipólisis de emulsiones estabilizadas por SPI (en comparación con emulsiones de β -lactoglobulina y Tween 80), se evaluó mediante el método pH-stat. Durante la fase duodenal de la digestión *in vitro*, las emulsiones de SPI mostraron el menor grado de lipólisis. Este comportamiento se relacionó con la capacidad de SPI para interactuar y reducir la actividad de las sales biliares (SB), componentes fisiológicos cruciales en el proceso de lipólisis. Las determinaciones interfaciales mostraron que la película interfacial formada por SPI presentó una baja susceptibilidad a la penetración de SB. Estudios en solución acuosa mostraron que SPI interactúa con las SB provocando su precipitación y consecuentemente reduciendo su capacidad para solubilizar los productos de la lipólisis. El grado de unión de las SB por SPI en el fluido intestinal simulado fue del 65,34 % relativo a la colestamina, fármaco conocido por su capacidad de ligar SB. Se puede concluir que SPI presenta el potencial de modular la digestión de lípidos y, en consecuencia, podría reducir el impacto negativo asociado con el alto consumo de alimentos hiperlipídicos.

INTRODUCCIÓN

Según datos publicados por la organización mundial de la salud (OMS), las enfermedades no transmisibles (ENT), tienden a ser de larga duración y resultan de la combinación de factores genéticos, fisiológicos, ambientales y conductuales. Las principales tipos de ENT son la obesidad, las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, las enfermedades respiratorias crónicas y la diabetes. Las ENT afectan desproporcionadamente a los países de ingresos bajos y medios, donde se registran más del 75% (32 millones) de las muertes por estas enfermedades (OMS, 2016). Si bien las ENT se suelen asociar a los grupos de edad más avanzada, los datos reportados (2016) mostraron que 15

millones de todas las muertes atribuidas a las ENT se produjeron entre los 30 y los 69 años de edad. Es así que niños, adultos y ancianos son todos ellos vulnerables a los factores de riesgo que favorecen las ENT, entre ellos, las dietas malsanas o hipercalóricas y el sedentarismo. Según los datos reportados por la OMS, desde 1975 a la actualidad, los casos de obesidad se han triplicado alrededor del mundo por lo cual ha sido denominada como la epidemia del siglo XX. Este organismo sostuvo que en el año 2016, el 39% de las personas adultas tenían sobrepeso y el 13% eran obesas. Argentina no es ajena a esta tendencia, según la Encuesta Nacional de Factores de Riesgo publicada por el Ministerio de Salud y el INDEC (2019)¹ el 61,6% de los argentinos tiene exceso de peso, en una proporción de 36,2% de personas con sobrepeso y 25,4% con obesidad. Los datos confirman el avance de la epidemia, si se considera que la obesidad alcanzó en el último estudio a un cuarto de la población y aumentó desde 2005 a la actualidad en casi 11 puntos porcentuales. Este avance está condicionado por las modificaciones de los regímenes alimentarios derivados de las variaciones en la disponibilidad y accesibilidad a los alimentos, la globalización de hábitos alimentarios y las tendencias a una menor actividad física por el desarrollo científico-tecnológico, la modernización de la economía y la urbanización. Siendo la dieta uno de los principales factores de riesgo que predisponen al desarrollo de obesidad y otras ENT, la ingeniería en alimentos tiene un desafío importante por delante, centrado en el desarrollo de nuevos alimentos e ingredientes funcionales que puedan hacer frente a estas enfermedades.

El desarrollo de estrategias que permitan controlar la digestión de lípidos dentro del tracto gastrointestinal humano podría dar lugar al diseño de alimentos funcionales que disminuyan el riesgo de sufrir enfermedades asociadas con la alta absorción de lípidos como la obesidad y las enfermedades cardiovasculares. Además, este conocimiento es importante para el desarrollo de sistemas de administración basados en lípidos que tienen como objetivo facilitar la incorporación de sustancias bioactivas (vitaminas liposolubles, ácidos grasos esenciales, fármacos, etc.) que presentan beneficios para la salud^{2,3}.

En la mayoría de los alimentos procesados, los lípidos son consumidos en forma emulsionada, es decir como emulsiones de aceite en agua (o/w), donde se encuentran dispersos en forma de gotas en un medio acuoso continuo. La superficie de estas gotas se encuentra cubierta por una capa de moléculas interfacialmente activas (emulsionantes), como proteínas, polisacáridos o sustancias de bajo peso molecular. Estas moléculas se adsorben en la interfase o/w jugando un papel importante, no solo en la formación y estabilidad de las emulsiones, sino también en su comportamiento durante el recorrido por el tracto gastrointestinal⁴. Numerosos trabajos en la literatura han evidenciado que las características de la película interfacial que rodea las gotas en una emulsión puede influir en el grado de digestión de los lípidos emulsionados, así como en la tasa de liberación de cualquier componente lipofílico atrapado en dicha emulsión⁵⁻⁷. Estos descubrimientos guardan relación con el hecho de que la lipólisis es un proceso interfacial, es decir que tiene lugar en la interfase o/w, sitio donde se encuentra la película interfacial del emulsionante y donde debe absorberse la enzima responsable de la digestión de lípidos, la lipasa pancreática. En el duodeno, donde se desarrolla la lipólisis en un 80%, la actividad de la lipasa pancreática, es facilitada por la presencia de sales biliares (SB), sintetizadas en el hígado y liberadas al duodeno a partir de la vesícula

biliar⁸. Estas moléculas, tienen actividad interfacial, por lo cual se adsorben en la interfase o/w, facilitando la emulsión de los lípidos, lo que da lugar a un incremento del área interfacial expuesta a la lipasa pancreática. La misma a continuación y en asociación con la colipasa, se adsorbe en la interfase para dar lugar a la hidrólisis de los triglicéridos (TG) y la consecuente liberación de una molécula de monoglicérido y dos ácidos grasos (AGL) por cada TG hidrolizado. Finalmente, estos productos luego se incorporan a las micelas de SB para ser transportados hacia el epitelio intestinal donde son absorbidos por los enterocitos. De esta forma, las SB remueven los productos de la digestión liberando la interfase para la continua actividad de la lipasa pancreática, garantizando la eficiencia del proceso de lipólisis^{2,9,10}.

Dilucidar el comportamiento de los alimentos en el tracto gastrointestinal es esencial para comprender mejor los efectos de los alimentos en la salud y luchar contra las patologías relacionadas con la dieta, como las ENT. A su vez este conocimiento permite el diseño de alimentos de alta calidad nutricional y sensorial para proporcionar al ser humano una dieta saludable. Sin embargo, durante muchos años, las investigaciones sobre la digestión de alimentos, han considerado al aparato digestivo humano como una caja negra, es decir algo complejo y organizado por distintos órganos, donde solo las entradas y salidas se consideraban objetivo de estudio. En este sentido, tradicionalmente las investigaciones han considerado a los alimentos de acuerdo con su composición, limitándose a monitorear los nutrientes en el torrente sanguíneo o demostrar los efectos fisiológicos de una dieta, sin un conocimiento real de los mecanismos de desintegración de los alimentos involucrados¹¹. Sin lugar a dudas, una mejor comprensión de los mecanismos que sustentan la digestión, enriquecen nuestro conocimiento sobre la cinética de hidrólisis y bioaccesibilidad de macronutrientes y, en consecuencia, la biodisponibilidad de nutrientes. Esta información resulta de gran importancia para el desarrollo de un enfoque de “ingeniería inversa”, es decir, a partir del efecto biológico o nutricional que se quiere obtener, deducir la estructura alimentaria adecuada y, en consecuencia, las condiciones de elaboración más relevantes para obtenerlo.

Sin embargo, para poder estudiar las interacciones de la matriz alimentaria con el aparato digestivo es necesario contar con herramientas que permitan simular el proceso de digestión. La digestión gastrointestinal simulada se emplea ampliamente en muchos campos de las ciencias de la alimentación y la nutrición, como alternativa a la realización de ensayos en humanos (métodos *in vivo*) que suelen ser costosos, requieren muchos recursos y son éticamente discutibles. En contraste, la utilización de modelos de digestión *in vitro* resulta en una alternativa simple, económica, reproducible y libre de restricciones éticas para simular el proceso de digestión de un alimento. La principal ventaja de aplicar metodologías *in vitro* radica en la posibilidad de realizar determinaciones que permitan entender el impacto de la estructura del alimento y su relación con los componentes fisiológicos presentes en la digestión, brindando información sobre la bioaccesibilidad de determinados nutrientes (es decir, la cantidad de un compuesto que se libera de la matriz y se considera que está disponible para la absorción a través de la pared intestinal). Estos métodos intentan imitar las condiciones fisiológicas *in vivo*, teniendo en cuenta la presencia de enzimas digestivas y sus concentraciones, pH, tiempo de digestión y concentraciones de sales, entre otros factores¹². Se han utilizado

modelos de digestión *in vitro* para abordar cuestiones científicas tan diversas como la digestibilidad y la bioaccesibilidad de productos farmacéuticos y macronutrientes como proteínas⁶, carbohidratos¹³ y lípidos¹⁴. También se han utilizado para estudiar la liberación de micronutrientes como minerales y oligoelementos y compuestos vegetales secundarios que incluyen carotenoides y polifenoles¹⁵.

La comunidad científica internacional muestra interés creciente en la mejora de las propiedades saludables de los alimentos y otros productos, y se esfuerza en ampliar su conocimiento en los procesos de digestión. Prueba de ello es la creación, en el año 2011, de la red INFOGEST (COST Action), red internacional de expertos en nutrición, gastroenterología y tecnología de alimentos, de la cual nuestro grupo de investigación es miembro. Entre los objetivos generales planteados por la red, se encuentra el diseño de nuevos alimentos con propiedades nutricionales y funcionales mejoradas, así como la creación de metodologías de estudios de digestión *in vitro* armonizadas y validadas, con el fin de mejorar el conocimiento sobre cómo la estructura de un alimento impacta en su recorrido por el aparato gastrointestinal.

En relación a lo planteado anteriormente y siendo que la reacción de lipólisis es un proceso interfacial, resulta de crucial importancia estudiar el impacto de la película de emulsionante adsorbida en la interfase o/w sobre dicha reacción. En este contexto, las características de la interfase, determinadas por la naturaleza del emulsionante, podrían afectar la velocidad y grado de lipólisis e impactar en la acción de las SB que tienen un rol tanto en facilitar la adsorción de la lipasa, como en la remoción de los productos de digestión. Se muestran a continuación un conjunto de estudios realizados en esta línea^{6,7,10,16–20} tendientes a identificar emulsionantes que permitan modular la digestión de lípidos.

Objetivo general

Estudiar el impacto de la composición y la estructura de la película interfacial de emulsiones aceite/agua en la digestión gastroduodenal *in vitro* de las mismas, con el propósito de identificar los factores que permiten retardar/inhibir el proceso de lipólisis.

Objetivos específicos

- Caracterizar la lipólisis de las emulsiones aceite/agua en relación a la naturaleza del emulsionante.
- Estudiar la evolución de las emulsiones durante la digestión gastroduodenal *in vitro*.
- Estudiar la resistencia que ofrece cada película interfacial de emulsionante a la penetración de las SB en la interfase aceite/agua.
- Estudiar la capacidad de los emulsionantes para interaccionar con SB en solución acuosa de un fluido intestinal simulado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como emulsionantes se utilizaron proteínas, β -lactoglobulina (β lg, Food Davisco International) y aislado proteico de soja (SPI), y como emulsionante de bajo peso molecular Tween 80 (T80, Biopack, grado alimentario). Las propiedades funcionales/estructurales y el comportamiento durante la digestión de β lg han sido extensamente estudiadas, motivo por el cual fue elegida como modelo de referencia. La utilización de proteínas vegetales en reemplazo de las

animales ha cobrado cada vez mayor importancia, siempre que sea una fuente proteica completa y de alta calidad. Las proteínas del poroto de soja no solo presentan estas cualidades, sino que su utilización resulta de interés particular debido a sus excelentes propiedades funcionales, entre ellas la formación y estabilización de emulsiones. En el presente estudio se utilizó un SPI soluble desnaturalizado térmicamente a partir de harina desgrasada de soja. Resulta de especial interés comparar el comportamiento de las proteínas con un emulsionante de bajo peso molecular como el T80 ampliamente utilizado en la industria alimentaria, debido a sus excelentes propiedades funcionales para formar y estabilizar emulsiones.

Obtención de emulsiones aceite en agua (o/w)

Se prepararon soluciones al 2% en agua destilada de los emulsionantes a partir de la cual se obtuvieron emulsiones o/w (10/90) con aceite de girasol comercial utilizando un procesador ultrasónico Vibra Cell Sonics, modelo VCX 750, a una frecuencia de 20 kHz y una amplitud del 20% a 0.5 °C.

Digestión gastroduodenal *in vitro*

La digestión gastroduodenal *in vitro* se llevó a cabo utilizando la metodología reportada por Bellesi y col (2016)⁶. La simulación de la digestión gástrica se llevó a cabo a partir de la utilización de un fluido (FGS) bajo condiciones fisiológicas (pH 2,5, NaCl, CaCl₂, NaH₂PO₄ y KCl), en presencia de pepsina y fosfatidilcolina (Sigma Aldrich). La mezcla de la emulsión y el fluido se mantuvo 1 h en agitación controlada a 37 °C y pH 2,5. Finalizada la etapa gástrica, se llevó el digerido a pH 7 (NaOH) y la digestión continuó con la incorporación de una solución que simula al fluido duodenal (FIS) con concentraciones fisiológicas de tripsina, quimotripsina, SB y lipasa pancreática (Sigma Aldrich). La mezcla se mantuvo en agitación controlada por 1 h a pH 7 y 37 °C.

Determinación del grado de lipólisis

Se utilizó un titulador automático (Titrand pH stat, Metrohm) con el fin de neutralizar (NaOH 0,5 M) los AGL producidos por acción de la lipasa pancreática en la etapa duodenal. A partir del volumen de NaOH utilizado, es posible estimar el % de AGL liberados como²¹:

$$\%AGL = ((V_{NaOH} (t) * M_{NaOH} * MWTG) / m_{TG} * 2) * 100$$

donde V_{NaOH} y M_{NaOH} son el volumen y la molaridad del NaOH utilizado, MW_{TG} es el peso molecular promedio de un TG de aceite de girasol y m_{TG} corresponde a la masa de TG presente al momento de incorporar la lipasa pancreática.

Análisis del tamaño de partícula

Se determinó el diámetro promedio (D_{3,2}), el área superficial específica (SSA) y las curvas de distribución de las gotas de las emulsiones por dispersión estática de luz (analizador de tamaño de partículas Mastersizer 2000, Malvern Instruments). Las determinaciones se realizaron tanto para las emulsiones iniciales como para tiempos intermedios durante el proceso de digestión gastroduodenal *in vitro*.

Microscopia óptica

La microestructura de las emulsiones o/w (iniciales y digeridas) se analizaron mediante microscopía óptica (OLYMPUS BX43). Cada muestra se agitó antes

del análisis y una gota de emulsión se colocó en el portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos y se observó con un aumento de 400 X.

Caracterización interfacial

Con la ayuda de un tensiómetro interfacial PAT-1 (SINTERFACE Technologies, Berlín, Alemania) empleando el método de gota pendiente, se obtuvo la variación de la presión interfacial (π) y los parámetros reológicos dilatacionales en función del tiempo para los diferentes emulsionantes. Para llevar a cabo las mediciones se formó una gota con la solución del emulsionante en la punta de un capilar, la cual queda inmersa en una cubeta, que contiene el aceite previamente purificado, en un compartimiento que permite regular la temperatura en 37 °C¹⁶.

Con el objetivo de estudiar el impacto de las SB (concentración fisiológica) sobre la película interfacial formada por cada emulsionante, se estudió el efecto que produce el intercambio de la subfase, empleando un sistema de doble capilar. Para tal fin, la solución de SB fue inyectada desde un capilar interno en el seno de una gota formada con la solución de emulsionante desde el capilar externo. Como parámetros de respuestas a tal perturbación, se determinaron las variaciones en los valores de π como en los parámetros reológicos.

Capacidad de solubilización de ácido un ácido graso

Para determinar la solubilidad de un ácido graso (ácido oleico, AO) se midió la turbidez con un turbidímetro (VELP Scientifica) a una longitud de onda de 850 nm (37 °C). Se analizó la evolución de la turbidez tras la adición continua de volúmenes de 50 μ L de AO en 100 ml de FIS. A la hora de analizar la capacidad que tienen las SB para solubilizar AO se repitió el procedimiento anterior en presencia de SB (0,5 % p/p) en el FIS. Para estudiar el impacto de la presencia de SPI en la capacidad de solubilización de las SB, se realizaron las mismas determinaciones en presencia de un sistema mixto formado por SPI (1,5 % p/p) y SB (0,5% p/p). Finalmente, se determinó el mecanismo de “oiling-off”, entendido como la cantidad de AO que deja de estar solubilizado en el medio acuoso. Esta cantidad se determinó a las 48 horas de haber dejado en reposo el sistema en una cámara termostatzada a 37 °C.

Capacidad de unión de los emulsionantes a SB en solución acuosa

El ensayo de unión *in vitro* a las SB se llevó a cabo mediante el método de Yoshie-Stark y Waßsche (2004)²². Las muestras de emulsionante (2% p/p) se mezclaron con una solución de SB (1,5 mM) en FIS (pH 7,0) y se incubaron a 37 °C durante 2 h. A continuación se centrifugaron y el contenido de SB en el sobrenadante se analizó espectrofotométricamente (530 nm) utilizando un kit de análisis de ácidos biliares (Diazyme). La resina de colestiramina, un fármaco que se une a las SB y se utiliza como tratamiento para reducir el colesterol en sangre, fue utilizada como control positivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comportamiento de las emulsiones durante la digestión gastroduodenal *in vitro*

El tamaño de las gotas de las emulsiones se ve afectado en su paso por el sistema gastrointestinal, afectando el área interfacial disponible para la acción de la lipasa al llegar al duodeno, donde ocurre principalmente la lipólisis. Por ello es clave analizar los cambios sufridos en este tránsito. En la Figura 1 se

muestra la distribución de tamaño de partícula de las emulsiones a lo largo del proceso de digestión *in vitro* estabilizadas con β lg (Fig. 1A), SPI (Fig. 1B) y T80 (Fig. 1C) donde se han incluido también las imágenes obtenidas por microscopía óptica en cada una de las etapas de la digestión. Las emulsiones iniciales (sin digerir) mostraron poblaciones monomodales con un tamaño de gota inferior a $0,3 \mu\text{m}$ (Tabla 1), lo que refleja las excelentes propiedades emulsionantes de los sistemas utilizados y su capacidad para generar una gran área interfacial o/w con valores de SSA comprendidos entre $17,5$ y $22,1 \text{ m}^2/\text{g}$ (Tabla 1). En las imágenes microscópicas se pudo observar que en todos los casos estudiados se obtienen sistemas homogéneos en correlación con la distribución obtenida. A pesar de que las tres emulsiones de partida presentaron iguales tamaño de gota, durante la fase gástrica, las emulsiones proteicas experimentaron un elevado grado de desestabilización, aumentado notablemente el tamaño de las gotas de aceite. Como se ve en las imágenes microscópicas (Fig. 1A y 1B) estos incrementos pueden atribuirse a la floculación de las gotas de aceite. La emulsión de β lg fue la que experimentó el mayor grado de floculación, lo que dio lugar a valores de $D_{3,2}$ que duplican a los obtenidos por SPI hacia el final de la etapa gástrica (Tabla 1). En esta instancia, las emulsiones proteicas presentaron una distribución monomodal, con diámetros promedio que superan los $7 \mu\text{m}$. El fenómeno de floculación se ve favorecido por el bajo pH del medio (2,5), como así también por la proteólisis de la película interfacial llevada a cabo por pepsina. Estos factores provocan una reducción de la carga superficial de las gotas y una disminución del espesor de la película, promoviendo la desestabilización de la emulsión²³. Es importante considerar que las proteínas utilizadas presentan valores de punto isoeléctrico ácido (4-5), por lo que el paso de la emulsión inicial (pH 7) hacia las condiciones gástricas (pH 2,5) promueve la reducción de la carga superficial y por lo tanto la interacción de las gotas con la consecuente formación de flóculos (Fig. 1A y 1B). Por el contrario, la emulsión formada con T80 (Fig. 1C) no presentó cambios en la distribución durante la etapa gástrica, hecho que también puede evidenciarse al observar las imágenes obtenidas por microscopía. Este comportamiento puede atribuirse a que al ser un emulsionante no proteico y no iónico, no es afectado por la pepsina, ni por los cambios de pH o fuerza iónica. En concordancia con la distribución de tamaño obtenida, la Tabla 1 indica que prácticamente los valores de $D_{3,2}$ (y el SSA) no presentaron cambios significativos durante la fase gástrica.

	β lg		SPI		T80	
	$D_{3,2} (\mu\text{m})$	SSA (m^2/g)	$D_{3,2} (\mu\text{m})$	SSA (m^2/g)	$D_{3,2} (\mu\text{m})$	SSA (m^2/g)
t_0	$0,277 \pm 0,001$	$22,1 \pm 0,1$	$0,278 \pm 0,001$	$17,5 \pm 0,6$	$0,283$	$21,2$
t_g	$14,6 \pm 0,1$	$0,41 \pm 0,04$	$7,4 \pm 0,1$	$0,581 \pm 0,008$	$0,277$	$21,7$
t_d	$0,46 \pm 0,03$	$12,9 \pm 0,9$	$0,43 \pm 0,08$	$14,2 \pm 2,6$	$0,276$	$21,7$

Tabla 1. Área superficial específica (SSA) y tamaño promedio de partícula ($D_{3,2}$) de las emulsiones iniciales (t_0), al final de la etapa gástrica (t_g) y al final de la etapa duodenal (t_d).

Durante la fase duodenal, los principales cambios se observaron nuevamente, sobre las emulsiones proteicas (Fig. 1A y 1B). En ambos casos, las distribuciones pasaron a ser multimodales pero con predominancia de las poblaciones con menor tamaño, obteniéndose valores de diámetro promedio del orden de los $0,45 \mu\text{m}$ (Tabla 1). Estos cambios podrían atribuirse

principalmente a la proteólisis llevada a cabo por las enzimas duodenales, tripsina y quimotripsina, y a la emulsificación llevada a cabo por las SB, las cuales, como se observa en la microscopía, rompen los flóculos formados durante la fase gástrica. Este fenómeno, a su vez, da lugar a un aumento de los valores de área interfacial (Tabla 1) lo que favorece la actividad de la lipasa pancreática. Por otra parte, la presencia de picos en la zona de tamaños menores también se relaciona con la formación de micelas de SB, las cuales contienen los productos de la digestión de TG.

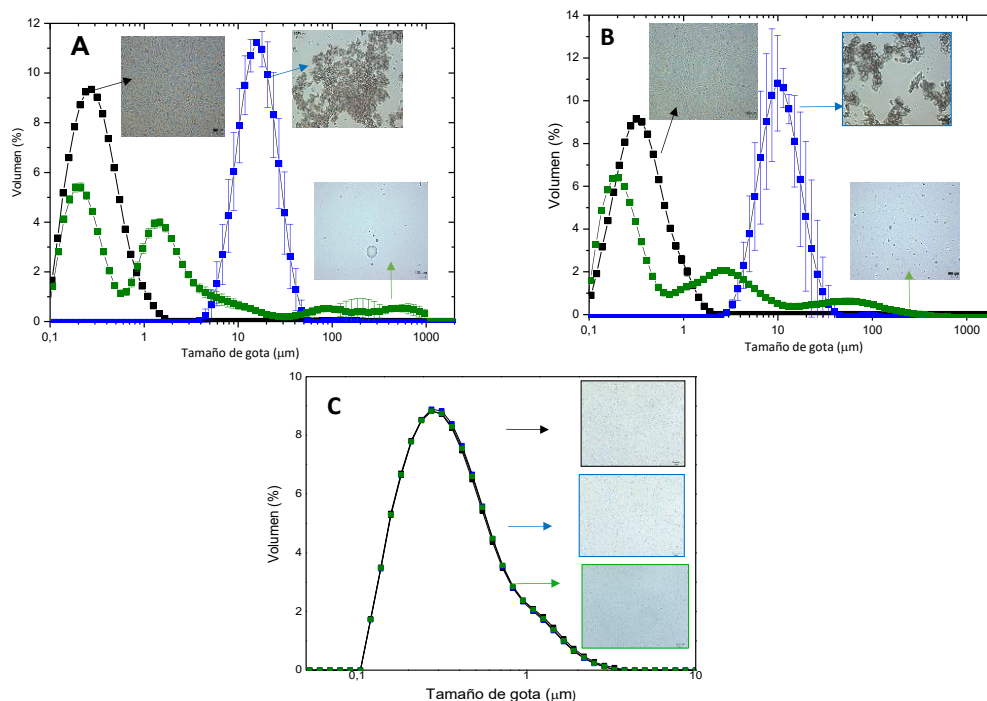


Figura 1: Variación de la distribución de tamaño de gota de aceite e imágenes microscópicas para emulsiones estabilizadas por β lg (A), SPI (B) y T80 (C) a lo largo del proceso de digestión gastroduodenal *in vitro*: Emulsión inicial (■), al final de la fase gástrica (■), al final de la fase duodenal (■).

Para el caso de la emulsión estabilizada con T80 se observa que la distribución permanece prácticamente idéntica a la inicial, lo que indicaría que la emulsión no fue afectada por las condiciones del medio digestivo, permaneciendo estable tanto en la fase gástrica como en la duodenal. De igual forma a lo concluido en la fase gástrica, se trata de un emulsionante sintético que no es afectado por las proteasas duodenales ni por los cambios de pH o fuerza iónica. El mismo comportamiento se evidencia al analizar las imágenes microscópicas, donde se observa que la microestructura de la emulsión se mantiene uniforme, sin evidenciarse presencia de flóculos y/o gotas de mayor tamaño. Finalmente, la Tabla 1 refleja el mismo comportamiento dado que los valores de $D_{3,2}$ y SSA no experimentaron cambios significativos. En este caso, debido a que las gotas de aceite son muy pequeñas, no es posible identificar la presencia de micelas de SB, cuyo tamaño se superpone con el de las gotas de la emulsión. Sin embargo, al ser la emulsión que mantiene los mayores valores de SSA durante todo el proceso, y en particular (en comparación con las emulsiones proteicas) al final de la fase gástrica, es de esperar un elevado grado de lipólisis, dada la mayor área disponible para la adsorción de la lipasa

pancreática. Los resultados de la reacción de lipólisis serán analizados en la siguiente sección.

Cinética del proceso de lipólisis

En la Figura 2 se muestra la cinética de liberación de los ácidos grasos durante la etapa duodenal (1h), para cada una de las emulsiones. En todos los casos se observó un rápido incremento durante los primeros 10 minutos en el porcentaje de ácidos grasos liberados (% AGL), previo a alcanzar un valor de pseudoequilibrio a tiempos mayores. En trabajos previos se ha comprobado que al trabajar con suficiente concentración de lipasa pancreática, su adsorción a la interfase o/w es casi inmediata a su incorporación al medio de reacción. A raíz de esto, el proceso de lipólisis (que da lugar a la liberación de AG) comienza de manera inmediata una vez que se ha incorporado la lipasa pancreática, sin evidenciarse la existencia de un período de inducción^{24,25}. La disminución en la velocidad de lipólisis en el tiempo puede asociarse con la liberación de los productos de reacción (AGL y MG) que al tener actividad interfacial, se acumulan en la superficie de las gotas de aceite, actuando como inhibidores de la lipasa y por lo tanto reduciendo su actividad^{26,27}.

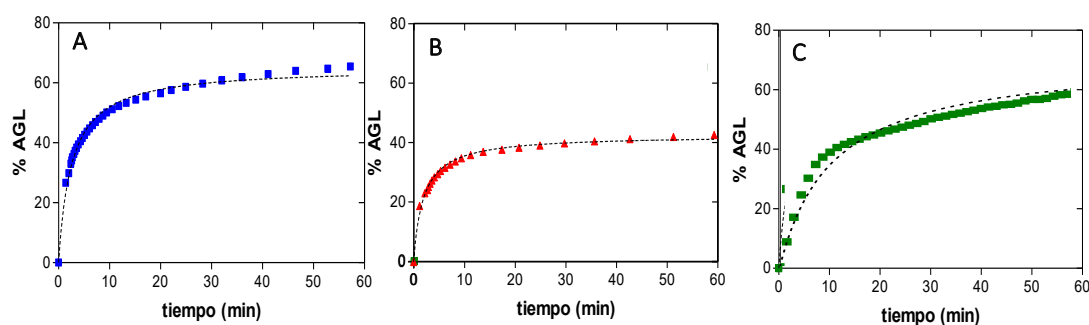


Figura 2: Liberación de los ácidos grasos (% AGL) en el tiempo durante la fase duodenal de la digestión *in vitro* de las emulsiones estabilizadas por: βlg (A), SPI (B) y T80 (C).

Se puede observar que el valor máximo de liberación de ácidos grasos (luego de 1 h) obtenido para las emulsiones estabilizadas por SPI ($42,5 \pm 0,3$ %) fue inferior al obtenido por las emulsiones estabilizadas por βlg ($65,42 \pm 0,5\%$) o T80 ($58,6 \pm 5,1\%$).

Al tratarse de un proceso interfacial (la lipasa pancreática debe unirse a la interfase o/w mediante complejación con SB y colipasa), resulta interesante analizar el impacto del área interfacial expuesta de cada emulsión con el grado de lipólisis obtenido. En este sentido, a pesar de que todas las emulsiones partieron del mismo tamaño de gota inicial (y similares valores de SSA) alcanzaron diferentes grados de lipólisis. Este hecho refleja el impacto de la naturaleza del emulsionante que, en mayor o menor medida, será en parte responsable de los fenómenos que tienen lugar en la interfase o/w durante la digestión de lípidos. Estos fenómenos incluyen la adsorción interfacial de las SB, necesaria para la adsorción de la lipasa pancreática y la remoción de los productos de la digestión en micelas de SB, los cuales serán analizados en las siguientes secciones.

Comportamiento de las interfases o/w en presencia de SB

Siendo que las SB cumplen un rol clave en el proceso de lipólisis, en esta sección se analizará el impacto de una solución de SB, a concentración fisiológica, sobre películas interfaciales adsorbidas en la interfase o/w. Los emulsionantes elegidos fueron SPI, dado que mostró el menor grado de lipólisis y β lg, adoptada como proteína de referencia que, al contrario a lo observado con SPI, mostró un elevado grado de lipólisis (Fig. 2). Se estudiará el impacto de las SB tanto en la cinética de adsorción interfacial como en las propiedades reológicas.

1-Adsorción competitiva: SB vs Emulsionantes

En este apartado se estudiará en primer lugar la adsorción competitiva entre las SB y cada uno de los emulsionantes, es decir, se evaluará la competencia entre los componentes (sistemas mixtos) durante su co-adsorción en la interfase o/w en relación al comportamiento de los sistemas individuales.

En la Figura 3 se muestra el comportamiento interfacial de cada proteína en la interfase o/w bajo condiciones intestinales simuladas. La variación de π con el tiempo se asocia con el aumento de la concentración de proteínas que se adsorben en la interfase. Como se detalla en la literatura, esta adsorción tiene lugar en tres pasos diferentes que incluyen: la difusión de la proteína desde el seno de la solución acuosa a la interfase, su adsorción y despliegue, y finalmente, la reorganización de la proteína adsorbida²⁸. Comparando estos resultados con la cinética de adsorción de las SB (Fig. 3, símbolos azules), se puede observar que estas últimas alcanzan un valor de π constante en menos de cuatro minutos, mientras que las proteínas requieren tiempos mayores. Estas diferencias indican que las proteínas se absorben más lentamente en la interfase que las SB, hecho que puede asociarse a las diferencias en la forma, estructura y/o tamaño de las moléculas y a la elevada actividad interfacial de las SB.

La dinámica de co-adsorción de los sistemas mixtos también fue analizada (Fig. 3, símbolos llenos). La evolución en el tiempo de π para el sistema mixto formado por SB y β lg (Fig. 3A) fue similar a la de SB solas, lo que indica que en la interfase la presión interfacial estaría dominada por las SB, ya que las moléculas de SB tienden a ocupar la interfase muy rápidamente. Estos resultados corroboran el hecho de que no existiría sinergismo en estas mezclas, en concordancia con lo reportado por Maldonado-Valderrama y col. (2008)²⁹. Sin embargo, la mezcla de SB con SPI (Fig. 3C) presentó valores de π mayores que el correspondiente a SB solas, lo que indicaría la presencia de ambos componentes en la interfase.

En la figura 3 (B y D) se observan los valores del módulo de dilatación interfacial (E) correspondientes a películas obtenidas para cada uno de los sistemas estudiados. La determinación de parámetros reológicos es de suma importancia ya que refleja las interacciones posibles entre la película interfacial y otros componentes fisiológicos, como la SB³⁰. Valores muy bajos de E fueron evidenciados para las películas de SB, los cuales reflejan el bajo grado de interacción que se establece entre las SB en la interfase^{9,31} e indicaría que prácticamente no hay respuesta de tales películas interfaciales frente a las deformaciones sinusoidales aplicadas. Este resultado guarda relación con los publicados por Wilde y Chu (2011)³² quienes indicaron que, la morfología de las SB origina una baja densidad de empaquetamiento interfacial, dando lugar a la formación de una película altamente móvil o de bajo carácter sólido.

Por el contrario, las películas formadas por ambas proteínas, mostraron mayor carácter elástico (mayores valores de E). El incremento de E con el tiempo está asociado con la adsorción de proteínas en la interfase o/w lo que refleja la existencia de interacciones proteína-proteína, las cuales se incrementan con el tiempo de adsorción³³.

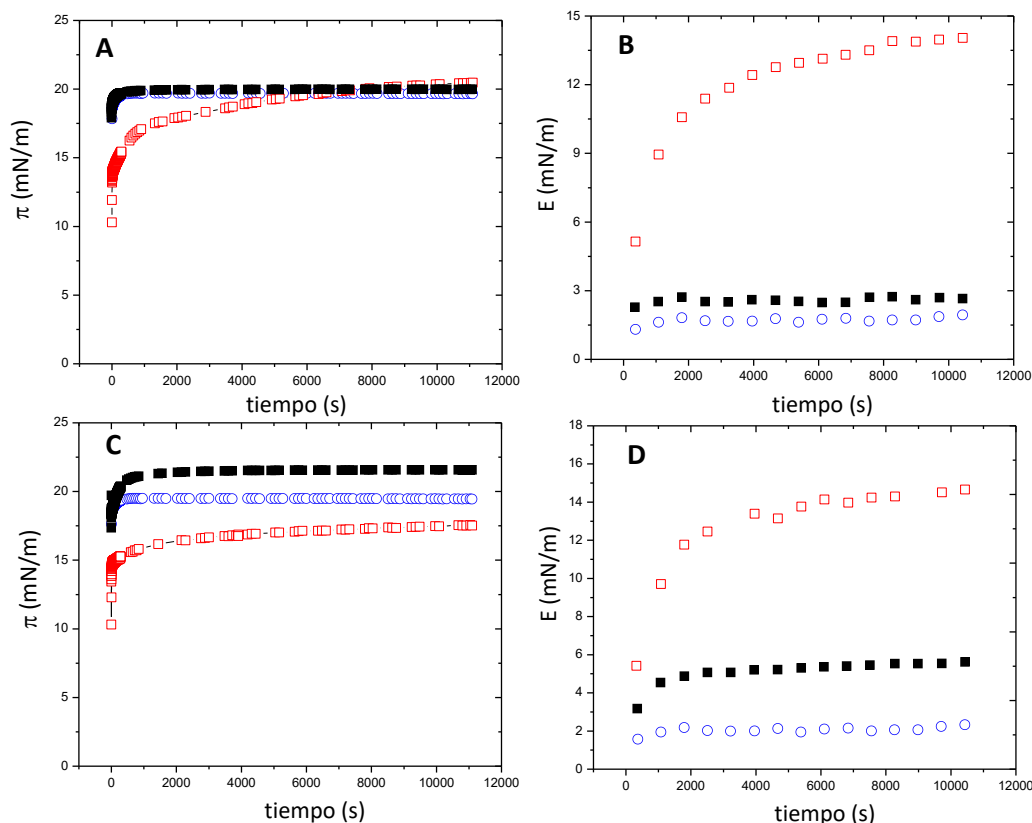


Figura 3: Variación de la presión interfacial (A y C) y del módulo dilatacional interfacial (B y D) para películas interfaciales formadas por β lg (A, B) y SPI (C y D). Proteína 2% p/p (\square) y BS 5 mg/ml (\circ). Los sistemas mixtos se representan con símbolos completos (\blacksquare).

La co-adsorción de SB y β lg (Fig. 3B) dio lugar a películas interfaciales con valores de E similares a los obtenidos para las SB solas, comportamiento que coincide con el observado al analizar la presión interfacial (Fig. 3A), lo que confirma el hecho de que la interfase está ocupada principalmente por SB. Sin embargo, en el sistema mixto formado por SPI y SB (Fig. 3D), los valores de E fueron más altos que los obtenidos por las SB, lo que refleja una mayor grado de coexistencia entre ambos componentes en la interfase o/w en correlación con los resultados de presión interfacial (Fig. 3C).

2-Adsorción secuencial: SB vs Emulsionantes

Los ensayos para evaluar el grado de resistencia que podría presentar la película de emulsionante al desplazamiento interfacial que pueden llevar a cabo las SB (en la fase duodenal de la digestión) se realizaron mediante una adsorción secuencial, empleando el sistema del doble capilar del tensiómetro interfacial explicado previamente. Para esto se formó una película de emulsionante y posteriormente, a los 8000 segundos, se inyectó la solución de SB (5 mg/ml). A este tiempo de adsorción suficientemente largo, todos los

emulsionantes estudiados alcanzan un valor de pseudo-equilibrio para π (Fig. 3A y C), indicando la saturación de la interfase, y además forman una película elástica lo suficientemente estable (Fig. 3B y D). La importancia de los resultados que se obtengan de este estudio radica en que se podría obtener información de la acción de las SB sobre las películas interfaciales bajo condiciones semejantes a las condiciones del duodeno (soluciones preparadas en FIS) simulando de esta manera el proceso interfacial que tiene lugar cuando una emulsión llega al duodeno y toma contacto con una solución fisiológica de SB, iniciando el proceso de digestión de lípidos⁸.

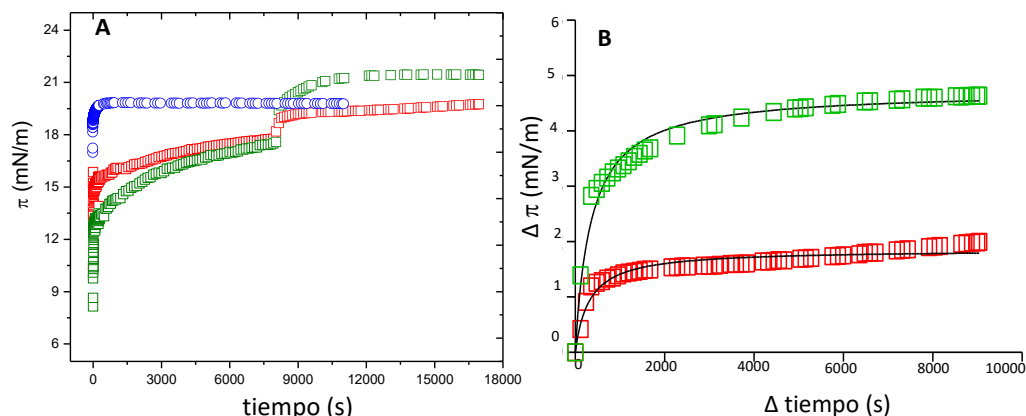


Figura 4: (A) Variación de π con el tiempo tras la adición secuencial de una solución de SB a 37 °C sobre películas de β lg (\square) y SPI (\square). Los valores de π para las SB se muestran como referencia (\circ). (B) Aumento de π tras la introducción de las SB a los 8000 s para β lg (\square) y SPI (\square).

Se puede observar, en la Figura 4, que tras la inyección de las SB se produce un rápido aumento en π para ambos sistemas hasta valores similares, o incluso algo mayores, que los correspondientes a las SB solas (~19,5 mN/m), lo cual indica que las SB han penetrado ambas películas. Para la película formada por SPI, los valores de π alcanzados fueron mayores que los obtenidos para las SB solas, lo que estaría sugiriendo que estas proteínas no serían desplazadas totalmente de la interfase. En el caso hipotético de que las moléculas de SB hubieran desplazado totalmente a las moléculas de proteína adsorbidas en la interfase, y esta quedara ocupada únicamente por las SB, sería de esperar que los valores de π coincidieran con los de las SB solas, ya que en este caso el emulsionante hubiese pasado a la solución. Por lo tanto, cuanto más alejados se encuentren los valores de π del valor para las SB, mayores serán los indicios de la permanencia del emulsionante en la interfase. Para el caso de las películas interfaciales formadas por β lg, a diferencia de lo observado con SPI, al final de la medida, se obtuvieron valores de π más bien similares a los de las SB. Estos resultados indicarían que las SB dominan las características de la interfase formada, algo que ya habían comprobado otros autores al trabajar con películas interfaciales formadas por proteínas^{29,34}.

El grado en que aumentan los valores de π tras la inyección de las SB puede ser utilizado para establecer un orden tentativo del impacto que presentan las SB en cada una de las películas interfaciales. A tal fin se graficó el aumento de π por encima del valor que tenía la película en el momento de la inyección de las SB, a los 8000 s (Fig. 4B). A partir de esta figura, se puede inferir que los

sistemas que sufran los mayores aumentos de presión interfacial serían aquellos donde el emulsionante es menos desplazado por las SB y por lo tanto puede contribuir a la obtención de un valor de π por encima del obtenido para las SB. Se podría establecer entonces que la película formada por SPI sería la menos desplazada por las SB, ya que es aquella en la que se produce un mayor incremento en los valores de π tras su inyección (Fig. 4B). Por otra parte, en las películas interfaciales de β lg, se produce el menor incremento de π , alcanzándose un valor muy similar al de las SB solas. Esto indicaría que estas películas serían bastante penetradas por las SB y las moléculas de β lg podrían estar siendo desplazadas de la interfase, por lo menos en mayor medida que SPI.

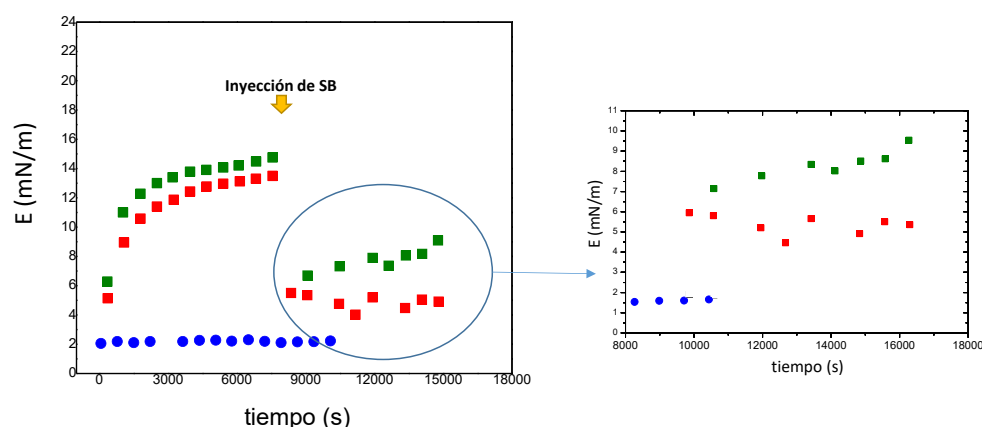


Figura 5: Variación del módulo dilatacional (E) con el tiempo tras la adición secuencial de una solución de SB a 37 °C sobre películas proteicas (2% p/p) de β lg (■) y SPI (■). Se muestra como referencia el resultado de las SB a 5mg/ml (●).

En la Figura 5, se observan los valores de E de las películas interfaciales antes y después de la inyección de la solución de SB. Como se indicó anteriormente, ambas proteínas se caracterizaron por la formación de una película interfacial elástica, sin embargo, tras la inyección de las SB (a los 8000 s) se observó que los valores de E disminuyeron rápidamente en distinta intensidad. Esta disminución indica que las películas interfaciales, serían bastante perturbadas tras la adsorción de las SB, que ingresarían en imperfecciones de cada película evitando, en cierto grado, las interacciones entre las moléculas de emulsionante adsorbidas. Al comparar los emulsionantes, se deduce que la película interfacial formada por β lg sería la más perturbada por la incorporación de las SB, dado que alcanzó valores de E muy similares a los de las SB solas (mostradas en azul como referencia), en concordancia con los efectos observados al analizar la variación que experimentó la presión interfacial.

Para analizar este fenómeno se procedió a cuantificar la variación experimentada por los valores de E tras la incorporación de las SB en cada uno de los casos. En la Tabla 2 se muestra, en la primer columna, la variación experimentada por E entre el instante en que se introdujeron las SB al medio (E_{8000}) y el instante en que se obtuvo el primer valor de E tras dicha adición (E_{9800}), es decir, se estaría analizando la perturbación inicial que sufre el sistema por la incorporación de la solución de SB. En la siguiente columna se representa la variación que experimentó el valor de E entre el momento de adición de las SB (E_{8000}) y el valor final obtenido (E_{Final}). De aquí se puede

deducir que la película de β lg (disminución de los valores de E en un 55%) resultó más perturbada que la película formada por SPI, donde la pérdida de elasticidad fue del 50 %. Estos datos indican en ambos casos que la presencia de las SB impide la asociación de las proteínas en la interfase para mantener la elasticidad inicial característica. Un fenómeno llamativo es que, tras la adsorción de las SB, en el caso de las películas formadas por SPI, el valor de E experimentó un ligero ascenso con el transcurso del tiempo (Fig. 5B), hecho que podría estar relacionado con cambios conformacionales en la película interfacial que involucran el grado de interacción entre las moléculas proteicas adsorbidas en la interfase. Este fenómeno nos permite confirmar que las proteínas de soja adsorbidas en la interfase no han sido desplazadas, al menos totalmente. La recuperación de la elasticidad interfacial solo se observó para la película formada por SPI. Como se observa en la Tabla 2, para la película de SPI, el valor de E solo se redujo en un 34 % al final de la experiencia, respecto al valor que tenía antes de la incorporación de las SB. Esta recuperación podría explicarse considerando el hecho de que las SB ingresarían a la interfase a partir de huecos o imperfecciones de la película interfacial, aumentando así el grado de compactación de las moléculas de proteína adsorbidas, generando por lo tanto un incremento en la rigidez de la película³⁵.

Proteínas	$\Delta E/E: (E_{8000} - E_{9800})/E_{8000}$	$\Delta E/E: (E_{8000} - E_{Final})/E_{Final}$
SPI	0,50 ± 0,01	0,34 ± 0,02
β lg	0,55 ± 0,01	0,60 ± 0,01

Tabla 2: Variación de E a partir de la adsorción de las SB en las diferentes películas interfaciales.

Por lo tanto, la interfase formada por la proteína de soja es la que resultó menos desestructurada por las SB, lo cual está de acuerdo con que esta proteína es la que pudo competir con las SB por un sitio en la interfase en las experiencias de co-adsorción realizadas, confirmando que ambas moléculas pueden coexistir en la interfase o/w. Considerando el rol de las SB en la digestión de lípidos, el hecho de que las proteínas de soja demostraran mayor resistencia a su actividad podría dificultar la adsorción posterior de la lipasa pancreática, lo que podría explicar el menor grado de lipólisis observado para las emulsiones estabilizadas por SPI (Fig. 2). Además, dada la compatibilidad/afinidad interfacial de las SB y las proteínas de soja, esta película podría constituir una barrera que dificulte la remoción interfacial de los productos de lipólisis en forma de micelas de SB. Este hecho aumentaría la presencia de AGL en la región interfacial, produciendo un efecto inhibitorio en la actividad de la lipasa. Por el contrario, que la película formada por β lg fuera más susceptible a la penetración de las SB, podría facilitar la adsorción de la lipasa pancreática y la remoción de los productos de la digestión. Esto permitiría la obtención de un mayor grado de lipólisis de sus emulsiones como se observó previamente (Fig.2).

Impacto de SPI en la solubilización micelar de ácidos grasos: modelo *in vitro*

En la Figura 6 se muestra la capacidad de SPI para perturbar la solubilización de un ácido graso modelo (ácido oleico, AO) en una solución micelar de SB preparada en el fluido intestinal simulado (FIS) a pH y temperatura fisiológica.

En primer lugar se determinó la solubilización de AO en FIS en ausencia de SB y SPI, con el objetivo de evaluar la solubilidad del ácido graso en este medio. La adición escalonada de AO al FIS, produjo el continuo aumento de turbidez (Fig.6). Se pudieron identificar dos regiones en la curva: la primera (entre 0 y 350 μL de AO añadido), donde la turbidez aumentó casi de forma lineal, y la segunda región (por encima de 350 μL) donde se produjo un aumento más pronunciado de la turbidez. Los análisis de distribución de tamaño de partícula (datos no mostrados), indicaron que durante la primera región el AO se presenta en forma de vesículas, que aumentaron de tamaño conforme aumentó el volumen de AO adicionado^{36,37}. A partir del punto de quiebre (en 350 μL), los resultados indicaron un cambio estructural en las vesículas de AO, lo que dio lugar a la aparición de gotas y la consecuente separación del AO formando una fase superior inmiscible. Este comportamiento sugiere que se ha alcanzado el límite de solubilidad del ácido graso, es decir, a partir de la adición de 350 μL , el sistema se encuentra saturado en AO, motivo por el cual todo el volumen adicionado en la segunda región, abandona la fase acuosa.

Cuando se estudió la solubilidad del AO en presencia de SB micelar (0,5 %p/p), se identificaron tres regiones en el perfil de turbidez: una primera región (0- 350 μL) donde se observa una disminución continua y leve de la turbidez; la segunda región (350-700 μL) donde los valores de turbidez permanecieron bajos y casi constantes y la tercera región (por encima de 700 μL), donde se evidenció un aumento pronunciado en los valores de turbidez. La disminución de los valores de turbidez en la región 1, puede asociarse a la ruptura de los agregados micelares formados por las SB²⁰, donde a medida que aumenta el contenido de AO (hasta 350 μL) se forman pequeñas micelas que contienen solubilizado al ácido graso. Estos resultados indican que, las pequeñas micelas de SB son capaces de solubilizar el AO agregado, evitando su asociación en forma de grandes vesículas que podrían incrementar los valores de turbidez^{38,39}. Conforme aumenta el contenido de AO, las micelas incrementan su tamaño dando lugar al incremento en los valores de turbidez obtenidos en la segunda región del perfil. Un claro punto de quiebre se evidencia (Fig. 6) al final de la segunda región (a 700 μL de AO añadidos), donde los valores de turbidez aumentan abruptamente. Este incremento representa el comienzo de la tercera región, que se correspondió con la aparición gotas de AO y la consecuente separación del ácido graso en una fase superior inmiscible, lo que indica que se ha alcanzado el límite de saturación del sistema. De acuerdo con estos resultados, se puede establecer que las SB solubilizaron 700 μL de AO, donde las micelas son las estructuras supramoleculares predominantes adoptadas en el medio acuoso.

De la comparación de la solubilidad del AO en ausencia y presencia de SB, se demuestra la excelente capacidad de las SB para solubilizar los productos de la lipólisis, una de sus principales funciones, ya que la solubilidad del AO se ha incrementado en un 100% por su presencia en el FIS.

Para analizar el impacto de las proteínas de soja sobre la capacidad de las SB de solubilizar AO se preparó una solución en FIS compuesta por SB (0,5%) y SPI (1,5%) sobre la cual se adicionaron en forma continua diferentes volúmenes de AO. Como se observa en la Fig. 6, se produce un aumento rápido en los valores de turbidez a partir del cual se pueden distinguir dos regiones: la primera (0-200 μL), caracterizada por un aumento lineal, y la segunda región, caracterizada por un incremento abrupto (a partir de 200 μL).

De la comparación con los sistemas anteriores, puede deducirse que el incremento abrupto podría relacionarse en parte con el límite de solubilidad del AO en el sistema, es decir que, a partir de la incorporación de 200 μL de AO, se favorecería la formación de gotas de gran tamaño responsables de los altos valores obtenidos en el perfil, las cuales a continuación abandonan la fase acuosa.

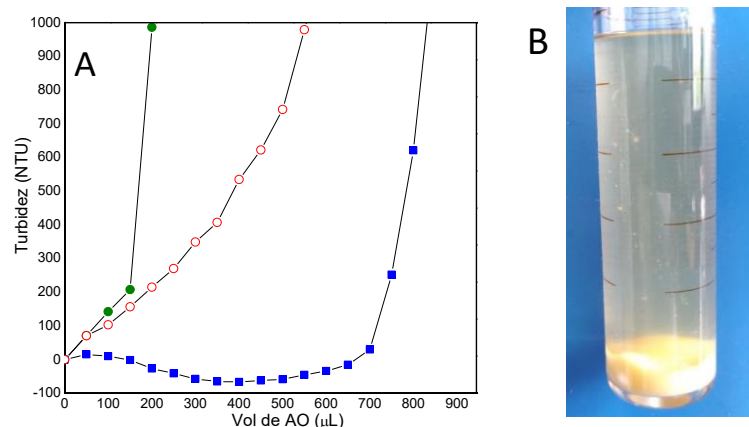


Figura 6: (A) Evolución de la turbidez de FIS tras la adición gradual de AO en ausencia (○) y presencia de 0,5% de SB (■) y un sistema mixto formado por 0,5% de SB y 1,5% de SPI (●). (B) Precipitado de SPI formado durante el ensayo.

Por lo tanto, se puede concluir que en presencia de SPI, la solubilidad del AO disminuyó considerablemente en relación a la obtenida cuando las SB se encontraban solas en solución a la misma concentración (700 μL de AO). Este hecho demuestra que las micelas de SB no se encuentran igualmente disponibles para solubilizar AO en presencia de la proteína. Es decir, los resultados sugieren que, la proteína de soja reduciría la capacidad de las SB para solubilizar los productos de la digestión como el AO. Un hecho importante a tener en cuenta es que, a los pocos minutos de iniciar la determinación en presencia de SPI, se produjo un precipitado formado principalmente por la proteína (Fig. 6B). Siendo que en el apartado anterior, se demostró que las proteínas de soja pueden interaccionar con las SB a nivel interfacial, podría pensarse que esta interacción también esté ocurriendo en la fase acuosa. Por lo tanto, de ser así, es de esperar que la precipitación de las proteínas de soja conlleve a un arrastre de las SB del medio, disminuyendo por lo tanto su disponibilidad para la solubilización del AO.

Interacción SPI-SB en solución acuosa

Durante la formación de una emulsión no todos los emulsionantes quedan adsorbidos en la interfase, sino que en presencia de exceso de emulsionante, muchos de estos quedarán suspendidos en la solución acuosa donde se encuentran dispersas las gotas de aceite. En este apartado se analizará la capacidad de estas proteínas para ligar SB en solución acuosa. Para tal fin, luego de mezclar el SPI con las SB por 2 horas en solución acuosa (FIS) a 37°C, se centrifugaron a alta velocidad para precipitar a la proteína. Sobre el sobrenadante obtenido, se determinó el contenido de SB, el cual corresponde a la SB libre, es decir, aquella que no se encuentra ligada a la proteína precipitada. De la comparación entre el contenido total de SB y la SB libre, se determinó el porcentaje de SB ligada a la proteína en comparación con un

control positivo (resina de colesteraquina). La colesteraquina es un fármaco recetado para el tratamiento de la hipercolesterolemia. Su principio de acción se basa en la capacidad de formar complejos iónicos no absorbibles con las SB, que son excretados con las heces. Con ello, una parte de las SB producidas en el hígado son eliminadas, motivo por el cual tiene lugar un proceso bioquímico compensatorio, que involucra la síntesis de SB para restaurar la fracción pérdida. Esta síntesis adicional, ocurre a expensas del colesterol circulante en sangre⁴⁰.

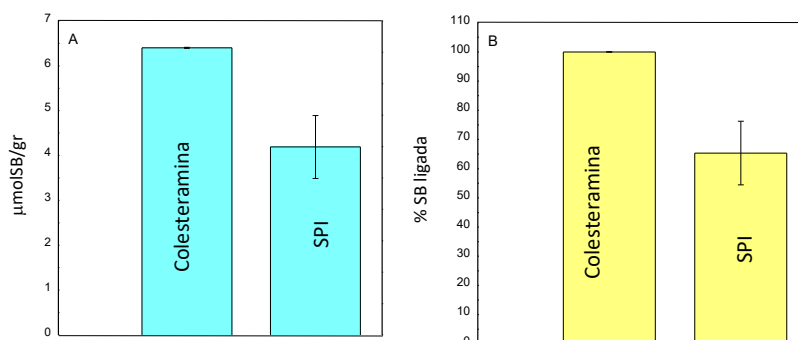


Figura 7: Capacidad de pagado de SB expresado como μmol de SB por gr de muestra (A). Porcentaje de pegado relativo a colesteraquina (B).

La Figura 7A representa los μmol de SB ligados por gramo de SPI o colesteraquina. Se puede comprobar que la proteína es capaz de ligar $4,19 \pm 0,70 \mu\text{mol/gr}$, mientras que el control positivo unió un total de $6,40 \pm 0,01 \mu\text{mol/gr}$ de colesteraquina. Estos resultados demuestran que las proteínas de soja, además de interaccionar con las SB a nivel interfacial, pueden hacerlo en solución acuosa. Por lo tanto, la precipitación de las proteínas observada en el apartado anterior, podría ocasionar el arrastre adicional de las moléculas de SB ligadas a SPI, disminuyendo entonces su disponibilidad para solubilizar las moléculas de ácido oleico.

Si consideramos a la colesteraquina como el 100% de unión, el valor de unión (relativo a la colesteraquina) de las proteínas de soja a la SB fue de un $65.34 \pm 10.9 \%$ (Fig. 7B).

En conclusión, estos resultados indican que las proteínas de soja son capaces de actuar sobre las SB siguiendo el mismo mecanismo que un fármaco sintético recetado para el tratamiento de la hipercolesterolemia, lo que determinaría su potencial aplicación para disminuir los niveles de colesterol en sangre. En la literatura existen algunos antecedentes que apoyan las interpretaciones obtenidas en el presente trabajo. Por ejemplo, Anderson, Johnstone y Cook-Newell (1995)⁴¹ demostraron la capacidad de las proteínas de soja para reducir los niveles de colesterol en sangre tanto en humanos como en animales de laboratorios, indicándose que el mecanismo de acción de estas proteínas incluiría la disminución de la adsorción intestinal de las SB.

CONCLUSIÓN

Los resultados presentados demostraron que el grado de lipólisis de las emulsiones obtenido durante la digestión gastroduodenal *in vitro*, depende del tipo de emulsionante adsorbido, siendo las estabilizadas por SPI, las que dieron lugar a un menor grado de lipólisis. Los factores investigados, moduladores del proceso, tienen que ver con el rol de las SB ya sea en: (a) La etapa de adsorción interfacial de estas moléculas para facilitar la adsorción del

complejo lipasa/colipasa, o bien, (b) La etapa de desorción y transporte en forma de micelas de los productos de la lipólisis. Estas micelas de SB a continuación liberan los componentes solubilizados en los enterocitos para luego transitar por el remanente del intestino delgado y grueso donde son reabsorbidas. Por lo tanto, si este mecanismo falla o es lento funcionará como una autorregulación de la lipólisis.

Con respecto a la etapa (a), los estudios de co-adsorción o adsorción secuencial de las SB indicaron que la película interfacial formada por SPI fue la menos perturbada, presentando la mayor compatibilidad interfacial con las mismas. Con respecto a la etapa (b) los estudios en solución acuosa demostraron la capacidad de las proteínas de soja para interaccionar con las SB, lo que podría ocasionar la disminución de su disponibilidad para desorber y transportar los productos de lipólisis, promoviendo la acumulación interfacial de los mismos y por ende la disminución o retardo del proceso de lipólisis.

A pesar de no encontrarse una inhibición total de la lipólisis, la reducción de su extensión, resulta de crucial importancia. Actualmente se considera que la velocidad a la cual los ácidos grasos son absorbidos (niveles postprandiales de triglicéridos) resulta de importancia para la salud ya que altos niveles están asociados con la activación de reacciones inflamatorias reconocidas como factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares y diabetes⁴².

A partir de la utilización de modelos de digestión *in vitro* se pudo evaluar el impacto de la estructura interfacial en la reacción de lipólisis de una emulsión aceite/agua. Estos métodos representan una alternativa simple, como primer paso de estudio, que permite entender cómo la estructura de un alimento impacta en su recorrido por el aparato digestivo, conocimiento de gran importancia para el diseño de alimentos que buscan un efecto biológico o nutricional determinado. Sin embargo, se requieren estudios *in vivo* para apoyar las conclusiones obtenidas a partir de modelos de digestión *in vitro*.

Bibliografía

1. Ministerio de Salud y Desarrollo Social, I. N. de E. y C. 4° *Encuesta Nacional de Factores de Riesgo. Resultados definitivos-Republica Argentina*. (2019).
2. Golding, M. & Wooster, T. J. The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion (2010). *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **15**, 90–101.
3. Li, Y., Hu, M. & McClements, D. J. Factors affecting lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model: Proposal for a standardised pH-stat method (2011). *Food Chem.* **126**, 498–505.
4. Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O. & McClements, D. J. Influence of particle size on lipid digestion and β -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions (2013). *Food Chem.* **141**, 1472–1480.
5. McClements, D. J. & Li, Y. Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems (2010). *Food Funct.* **1**, 32–59.
6. Bellesi, F. A., Martinez, M. J., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M. & Pilosof, A. M. R. Comparative behavior of protein or polysaccharide stabilized emulsion under in vitro gastrointestinal conditions (2016). *Food Hydrocoll.* **52**, 47–56.
7. Bellesi, F. A., Ruiz-Henestrosa, V. M. P., Maldonado-Valderrama, J., Del Castillo Santaella, T. & Pilosof, A. M. R. Comparative interfacial in vitro digestion of protein and polysaccharide oil/water films (2018). *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **161**, 547–554.
8. Bauer, E., Jakob, S. & Mosenthin, R. Physiology of Lipid Digestion

(2004). 282–295.

9. Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P., MacIerzanka, A. & MacKie, A. The role of bile salts in digestion (2011). *Adv. Colloid Interface Sci.* **165**, 36–46.
10. Pilosof, A. M. R. Potential impact of interfacial composition of proteins and polysaccharides stabilized emulsions on the modulation of lipolysis (2017). The role of bile salts. *Food Hydrocoll.* **68**, 178–185.
11. Dupont, D., Le Feunteun, S., Marze, S. & Souchon, I. Structuring food to control its disintegration in the gastrointestinal tract and optimize nutrient bioavailability (2018). *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **46**, 83–90.
12. Minekus, M. *et al.* A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus (2014). *Food Funct.* **5**, 1113–1124.
13. Hasjim, J., Lavau, G. C., Gidley, M. J. & Gilbert, R. G. In vivo and in vitro starch digestion: Are current in vitro techniques adequate? (2010). *Biomacromolecules* **11**, 3600–3608.
14. Larsson, K., Caviolius, L., Alminger, M. & Undeland, I. Oxidation of cod liver oil during gastrointestinal in vitro digestion (2012). *J. Agric. Food Chem.* **60**, 7556–7564.
15. Bouayed, J., Hoffmann, L. & Bohn, T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake (2011). *Food Chem.* **128**, 14–21.
16. Bellesi, F. A., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M. & Pilosof, A. M. R. Behavior of protein interfacial films upon bile salts addition (2014). *Food Hydrocoll.* **36**, 115–122.
17. Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M., Bellesi, F. A., Camino, N. A. & Pilosof, A. M. R. The impact of HPMC structure in the modulation of in vitro lipolysis: The role of bile salts (2017). *Food Hydrocoll.* **62**, 251–261.
18. Naso, J. N., Bellesi, F. A., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M. & Pilosof, A. M. R. Studies on the interactions between bile salts and food emulsifiers under in vitro duodenal digestion conditions to evaluate their bile salt binding potential (2018). *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **174**, 493–500.
19. Bellesi, F. A., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M. & Pilosof, A. M. R. Lipolysis of soy protein and HPMC mixed emulsion as modulated by interfacial competence of emulsifiers (2020). *Food Hydrocoll.* **99**, 105328.
20. Julieta N. Naso, Fernando A. Bellesi, Víctor M. Pizones Ruiz-Henestrosa, A. M. . P. A new methodology to assess the solubility of fatty acids: Impact of food emulsifiers (2020). *Food Res. Int. En prensa*.
21. Li, Y. & McClements, D. J. New mathematical model for interpreting ph-stat digestion profiles: Impact of lipid droplet characteristics on in vitro digestibility (2010). *J. Agric. Food Chem.* **58**, 8085–8092.
22. Yoshie-Stark, Y. & Wäsche, A. In vitro binding of bile acids by lupin protein isolates and their hydrolysates (2004). *Food Chem.* **88**, 179–184.
23. Li, J., Ye, A., Lee, S. J. & Singh, H. Influence of gastric digestive reaction on subsequent in vitro intestinal digestion of sodium caseinate-stabilized emulsions (2012). *Food Funct.* **3**, 320–326.
24. Mun, S., Decker, E. A. & McClements, D. J. Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase (2007). *Food Res. Int.* **40**, 770–781.
25. McClements, D. J. & Li, Y. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components (2010). *Adv.*

Colloid Interface Sci. **159**, 213–228.

26. Troncoso, E., Aguilera, J. M. & McClements, D. J. Fabrication, characterization and lipase digestibility of food-grade nanoemulsions (2012). *Food Hydrocoll.* **27**, 355–363.
27. Gallier, S. & Singh, H. Behavior of almond oil bodies during in vitro gastric and intestinal digestion (2012). *Food Funct.* **3**, 547–555.
28. MacRitchie, F. Protein adsorption/desorption at fluid interfaces (1989). *Colloids and Surfaces* **41**, 25–34.
29. Maldonado-Valderrama, J. *et al.* Interfacial characterization of β -lactoglobulin networks: Displacement by bile salts (2008). *Langmuir* **24**, 6759–6767.
30. Murray, B. S. Rheological properties of protein films (2011). *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **16**, 27–35.
31. Mackie, A. R., Gunning, A. P., Ridout, M. J., Wilde, P. J. & Patino, J. R. In situ measurement of the displacement of protein films from the air/water interface by surfactant (2001). *Biomacromolecules* **2**, 1001–1006.
32. Wilde, P. J. & Chu, B. S. Interfacial & colloidal aspects of lipid digestion (2011). *Adv. Colloid Interface Sci.* **165**, 14–22.
33. Ruíz-Henestrosa, V. P. *et al.* Interfacial and foaming characteristics of soy globulins as a function of pH and ionic strength (2007). *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **309**, 202–215.
34. Uri, L., Baudot, P. & McClements, D. J. Impact of interfacial composition on physical stability and in vitro lipase digestibility of triacylglycerol oil droplets coated with lactoferrin and/or caseinate (2010). *J. Agric. Food Chem.* **58**, 7962–7969.
35. Woodward, N. C., Gunning, A. P., Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P. J. & Morris, V. J. Probing the in situ competitive displacement of protein by nonionic surfactant using atomic force microscopy (2010). *Langmuir* **26**, 12560–12566.
36. Zakir, F., Vaidya, B., Goyal, A. K., Malik, B. & Vyas, S. P. Development and characterization of oleic acid vesicles for the topical delivery of fluconazole (2010). *Drug Deliv.* **17**, 238–248.
37. Verma, S. *et al.* Oleic acid vesicles : A new approach for topical delivery of antifungal agent Oleic acid vesicles (2013). *Artif Cells Nanomed Biotechnol* **2**, 95–101.
38. Hofmann, A. F. the Function of Bile Salts in Fat Absorption. the Solvent Properties of Dilute Micellar Solutions of Conjugated Bile Salts (1963). *Biochem. J.* **89**, 57–68.
39. Freeman, C. P. Properties of fatty acids in dispersions of emulsified lipid and bile salt and the significance of these properties in fat absorption in the pig and the sheep (1969). *Br. J. Nutr.* **23**, 249–263.
40. Kahlon, T. S. & Woodruff, C. L. In vitro binding of bile acids by soy protein, pinto beans, black beans and wheat gluten (2002). *Food Chem.* **79**, 425–429.
41. Anderson, J. W., Johnstone, B. M. & Cook-Newell, M. E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids (1995). *N. Engl. J. Med.* **333**, 276–282.
42. Singh, H. & Ye, A. Structural and biochemical factors affecting the digestion of protein-stabilized emulsions (2013). *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **18**, 360–370.

EL CASEINOMACROPÉPTIDO TIENE POTENCIAL PARA PREVENIR LA DEFICIENCIA DE CALCIO

CASEINOMACROPEPTIDE HAS POTENTIAL TO PREVENT CALCIUM DEFICIENCY

Loria, Karina Gabriela^{*1,2} y Farías, María Edith^{*1,3}

¹ Universidad Nacional de Luján. Departamento de Tecnología. Ruta 5 y Avenida Constitución - (6700) Luján, Buenos Aires, Argentina.

² Becaria posdoctoral Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

³ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Industrias. Ciudad Universitaria. Buenos Aires (1428), Argentina.

*Autores responsables de correspondencia: Email: efarias@mail.unlu.edu.ar

Resumen

La población mundial presenta una grave deficiencia en calcio por ello es fundamental incrementar su ingesta en la población y simultáneamente su bioaccesibilidad en los alimentos. El calcio es un elemento nutricional fundamental en la salud ósea a lo largo de toda la vida, y su deficiencia conduce a la aparición de trastornos en la salud, entre ellos, la osteoporosis. El caseinomacropéptido (CMP) es un péptido bioactivo que se encuentra presente en el suero de queso. Tiene un alto potencial como péptido ligante de calcio por diversos factores: su cadena peptídica es rica en aminoácidos glutámico y aspártico, su alta carga negativa a $\text{pH} > 4,5$, su alto grado de glicosilación abundante en ácido siálico (con capacidad de formar complejos con el calcio a $\text{pH} 7$), y su alta solubilidad en agua aún disuelto en altas concentraciones de CaCl_2 . Se evaluó, el efecto de la incorporación de CaCl_2 en la asociación molecular del CMP mediante la técnica de dispersión dinámica de luz láser. Adicionalmente, se analizaron los espectros infrarrojos con transformadas de Fourier (FTIR), se determinó el calcio dializado y se realizaron las isothermas de calcio unido mediante la técnica del electrodo selectivo. Las modificaciones observadas en los espectros de CMP y CaCl_2 a pH neutro confirmaron que el CMP interacciona con el calcio a través de los grupos carboxílicos que corresponderían a los residuos Asp y Glu. Los cambios en la zona de amidas indicaron cambios en la estructura secundaria del péptido. Por otro lado, los resultados de DLS mostraron la formación de estructuras asociadas por pares de moléculas de CMP (dímeros, tetrameros, hexámeros) en presencia de CaCl_2 , alcanzando un grado máximo de asociación, el hexámero, para la relación 9 – 10 moles de CaCl_2 por mol de CMP, similares resultados se obtuvieron con todas las técnicas empleadas. Este trabajo demuestra una nueva propiedad del CMP con alto valor agregado.

Palabras clave: caseinomacropéptido, calcio, péptidos ligantes de calcio, FTIR, deficiencia de calcio, electrodo selectivo, DLS, diálisis

Abstract

The world population is seriously deficient in calcium, thus it is essential to increase its intake and simultaneously its bioaccessibility in food. Calcium is a fundamental nutritional element in the bone health throughout life, and its deficiency leads to the appearance of health disorders, including osteoporosis. Caseinomacropeptide (CMP) is a bioactive peptide found in cheese whey. It has a high potential as a calcium-binding peptide due to various factors: its peptide chain is rich in glutamic and aspartic amino acids, its high negative charge at $\text{pH} > 4.5$, its high degree of glycosylation, sialic acid abundance (which has the ability to form complexes with calcium at $\text{pH} 7$), and its high solubility in water even dissolved in high concentrations of CaCl_2 . The effect of the incorporation of CaCl_2 on the molecular association of CMP was evaluated using the dynamic scattering technique. In addition, Fourier transform infrared spectra (FTIR) were analyzed, dialyzed calcium was determined, and bound calcium isotherms were performed using the selective electrode technique. The modifications observed in the CMP and CaCl_2 spectra at neutral pH confirmed that CMP interacts with calcium through the carboxylic groups that would correspond to Asp and Glu residues. Changes in the amide zone indicated the secondary structure of the peptide changes. On the other hand, the DLS results showed the formation of structures associated by pairs of CMP molecules (dimers, tetramers, hexamers) in the presence of CaCl_2 , reaching a maximum degree of association, the hexamer, for the ratio of 9 – 10 mol CaCl_2 for CMP mol, similar results were obtained with all the techniques used. This work demonstrates a new property of the CMP with high added value.

Keywords: caseinomacropeptide, calcium, calcium binding peptides, FTIR, calcium deficiency, selective electrode, DLS, dialysis

Introducción

En la Argentina, se considera que el requerimiento de calcio es 1.000 mg/día para la edad entre los 19 y 50 años (FAO 2001), independiente de la localización geográfica, situación socioeconómica. Según la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud de Argentina realizada en los años 2004-2005 en niños y mujeres entre 10 y 49 años, el calcio es uno de los nutrientes más críticos, el 94,3% de las mujeres presentaron una ingesta menor a la ingesta diaria recomendada (IDR). El 28% de los niños menores de 2 años no cubrieron la ingesta adecuada de este mineral, mientras que en el grupo de 2 a 5 años esta cifra llegó al 45,6%.

En la bibliografía se propusieron a numerosos péptidos de diferente origen como ligantes de calcio para aumentar su bioaccesibilidad. Se pueden citar péptidos obtenidos de espina de pescado (Wu et al. 2017, Chen et al. 2019), trigo, pepino o soja (Bao et al. 2007, Wang et al. 2017, Hou et al. 2018, Wang et al. 2018) o de origen lácteo como los caseinofosfopéptidos o proteínas del suero (Berrocal et al. 1989, Zhao et al. 2014). Sin embargo, en la mayoría de ellos, el uso comercial es muy limitado principalmente por la falta de tecnologías adecuadas para obtenerlos a gran escala (Korhonen et al. 2006). Por otro lado, el caseinomacropéptido (CMP), un péptido bioactivo producido durante la elaboración del queso, se encuentra en abundancia en el suero. Asimismo, está comercialmente disponible en forma de polvos de alta pureza obtenidos por resinas de intercambio iónico. Sus interesantes propiedades funcionales como la gelificación a temperatura ambiente, como espumante y emulsificante (Kreuz et al. 2009, Farías et al. 2010, Martinez et al. 2011, Morales et al. 2019) y valiosas propiedades bioactivas, entre ellas se distinguen su efecto antihipertensivo, antitrombótico, modulador de las hormonas de saciedad y su actividad antimicrobiana (Kawasaki et al. 1993, Dziuba et al. 1996, El-Salam et al. 1996, Brody 2000, Thomä-Worringer et al. 2006) y el manejo de la fenilcetonuria (Ney et al. 2008). Los péptidos con gran afinidad por el calcio típicamente contienen una gran cantidad de Glu y Asp, ya que contribuyen a la unión del calcio posiblemente al generar un ambiente ácido para que los cationes se coordinen (Peng et al. 2017). En la secuencia peptídica del CMP se encuentran 10 de estos aminoácidos ácidos: 8 residuos de Glu y 2 de Asp. Otras investigaciones (Tuan 1987, Choi 2012) muestran que los aminoácidos básicos también tienen afinidad con el calcio principalmente causada por los grupos $-NH_2$ o $-NH$ que pueden participar en la coordinación con el

calcio. Los aminoácidos básicos en el CMP son 3 residuos de Lys. Aproximadamente un 50% del CMP está glicosilado (Thomä-Worringer et al. 2006), y el ácido siálico (reconocido ligante de calcio) se encuentra entre un 5 y 11% en peso del total de CMP, dependiendo de su origen y modo de obtención (Fernando et al. 2010).

La existente necesidad de conversión del suero de queso en productos de mayor valor agregado para el aprovechamiento de sus nutrientes y al aporte al desarrollo regional y nacional y, la disminución del impacto ambiental por ser el suero un residuo altamente contaminante, además de la problemática nutricional, urge la necesidad de caracterizar al CMP como ligante de calcio. Para ello se evaluó el efecto de la incorporación de CaCl_2 en la asociación molecular del CMP mediante la técnica de dispersión dinámica de luz láser (DLS), se analizaron los espectros infrarrojos con transformadas de Fourier (FTIR), se determinó el calcio dializado y se realizaron las isotermas de calcio unido mediante la técnica del electrodo selectivo.

Materiales y Métodos

Materiales: Se utilizó caseinomacropéptido BioPURE-GMP® de Davisco Foods International (USA). Según el proveedor, su pureza fue (en base seca): $90,0 \pm 3,0\%$ (p/p) de CMP ($N \times 7,07$). Su contenido mineral (100 g de muestra): 950 mg de Na; 125 mg de K y 682 mg de Ca determinados mediante espectrometría de absorción atómica Analyst 200 Perkin Elmer (USA). Se utilizó CaCl_2 anhidro (Merck, Alemania) de calidad analítica. El agua utilizada para preparar las soluciones fue ultrapura (Thermo Scientific Barnstead, modelo Easypure RF) y su conductividad fue $1,8 \pm 0,1 \mu\text{S/cm}$. Se consideró un peso molecular para el CMP de 7500 Da.

Preparación de las soluciones: Se utilizaron concentraciones de CMP del 10 y 50 g/L. Las soluciones de CMP se prepararon como en Loria et al. (2018) hasta alcanzar la concentración de sal deseada (entre 0 y 250 mM) de CaCl_2 . El CMP es muy soluble en agua y no se formó ningún precipitado después de añadir las soluciones salinas. El pH se ajustó entre 7,0 y 9,0 con NaOH (c).

Dispersión Dinámica de Luz Láser (DLS): Las mediciones de tamaño de partícula fueron realizadas en un equipo de DLS Zetasizer Nano-Zs de Malvern Instruments (Malvern, Inglaterra) provisto de un láser He-Ne (633 nm) y un correlador digital, modelo ZEN3600 según la técnica descrita en Farías et al. (2010). Las mediciones fueron realizadas a un ángulo fijo de dispersión de 173° . El rango de medición del equipo fue 0,6–6000 nm. Los ensayos fueron realizados por triplicado y a 25°C . Las soluciones de pH 7,0 fueron previamente filtradas a través de microfiltros Whatman International Ltd. (Maidstone, Inglaterra) de 0,45, 0,22 y $0,02 \mu\text{m}$.

Fracción de calcio no dializable: Se transfirieron 5 ml de la solución de 10 mg/L CMP y 2 mmol/L CaCl_2 a la bolsa de diálisis que se sumergió en 250 mL de agua ultrapura con agitación durante 24 h a 20°C para remover el calcio libre. Los cambios de agua se realizaron cada 8 h. Antes de realizar los experimentos, los materiales utilizados fueron lavados previamente con EDTA 0,01 eq/L y enjuagados 5 veces con

agua ultrapura y la membrana de diálisis (Celulosa Ester de Biotech, MWCO: 100-500 Da, Spectrum Laboratories, Inc., USA) fue cortada en tiras de 20 cm y lavadas con agua ultrapura. La concentración de calcio libre se determinó por espectroscopía de absorción atómica con un espectrofotómetro AAnalyst 200 Perkin Elmer (USA). Previamente se agregó nitrato de lantano (1,5% p/v) a estándares, muestras y blancos para evitar la interferencia de fosfatos. El blanco consistió en dializar 5 mL de CMP 10 g/L. El pH se ajustó a 7,0. Los ensayos se realizaron por duplicado y simultáneamente.

Espectroscopía Infrarroja por Transformadas de Fourier (FTIR): Se utilizó 1 mg de cada una de las soluciones CaCl_2 -CMP (en las proporciones 0; 0,3; 1,2 y 2,0 mmol/g y pH 7,0) previamente liofilizadas, pulverizadas con 100 mg de KBr en un mortero de ágata y luego presionadas a 2000 kPa para obtener una pastilla. Los espectros fueron registrados a temperatura ambiente en un espectrofotómetro infrarrojo Shimadzu® (modelo IR Prestige-21, Japón) y el análisis de los espectros y los picos se realizó con el software OriginPro® 8 SR0, V8.0724, USA.

Determinación de calcio libre: El calcio unido (Ca_U) se determinó por el método de Berrocal et al. (1989) que consistió en la titulación de 50 mL de una solución de 2 g/L CMP con 200 mmol/L de CaCl_2 . La medición de la diferencia de potencial se midió con electrodo de ión selectivo modelo HI4104 conectado a un pHmetro modelo HI98191 (Hanna Instruments, USA) luego de la adición sucesiva de 50 mL de la solución de CaCl_2 . La fuerza iónica se ajustó con 0,705 mL de una solución 3,5 moles/L de KCl. La curva de calibración se realizó simultáneamente con los ensayos para verificar la respuesta lineal del electrodo. El pH se ajustó a 7,0; 8,0 y 9,0. El calcio unido (Ca_U) se obtuvo por diferencia entre el calcio total presente en la solución y el calcio libre determinado (Ca_L). Se graficaron los valores de la inversa de Ca_U en función de la inversa del Ca_L (Gráfico de Klotz) según la Ecuación (1):

$$\frac{1}{\text{Ca}_U} = \frac{1}{n_i K_{ap} \text{Ca}_L} + \frac{1}{n_i} \quad (1)$$

Análisis estadístico: Se utilizó el software GraphPad Prims v7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) para el análisis estadístico (ANOVA). Las diferencias fueron determinadas por la prueba de Tukey para $P < 0,05$.

Resultados y Discusión

Asociación molecular

En ausencia de CaCl_2 , las distribuciones por intensidades del tamaño de partícula por DLS fueron bimodales para 10 g/L y trimodales para 50 g/L (datos no mostrados). Sin embargo, la concentración de CMP no influyó en la posición del primer pico (2,3-2,5 nm) que fue el predominante. El software del equipo Zetasizer Nano-Zs permitió estimar el grado de asociación molecular por análisis de la posición del pico predominante, considerando que la forma monomérica del CMP (aproximadamente 7,5 kDa) (Farías et al. 2010). La **Figura 1** muestra el valor máximo del $d(H)$ del pico predominante y los correspondientes estados de asociación obtenidos en presencia de distintas cantidades de CaCl_2 para las dos soluciones de CMP (10 y 50 g/L). Se observó para ambas concentraciones, que el $d(H)$ se desplazó hacia tamaños mayores hasta alcanzar un valor máximo (5,6 nm). Es decir, el péptido en presencia de CaCl_2 se autoensambló principalmente siguiendo un mecanismo de dos en dos: desde monómeros a dímeros, tetrámeros y finalmente hexámeros dependiendo de la concentración de CaCl_2 presente en el medio. Esta asociación dependió de la relación $\text{CaCl}_2/\text{g CMP}$ y no de la concentración de sal en la solución. Basados en nuestros hallazgos, se puede afirmar que el CMP se asocia en presencia de CaCl_2 desde los monómeros hasta los dímeros (0,3 - 0,4 mmoles CaCl_2/g de CMP), luego a tetrámeros (0,7 - 0,8 mmoles CaCl_2/g de CMP), y finalmente hexámeros (1-1,2 mmoles CaCl_2/g de CMP que equivale a una relación de 7,5-9 mol CaCl_2 por mol CMP), donde alcanzó su estado de asociación máximo indicando que esta relación es su máxima capacidad ligante.

Espectroscopía FTIR

La mayoría de las moléculas absorben luz en la región infrarroja del espectro electromagnético, típicamente entre 4000 y 500 cm^{-1} . La energía absorbida se relaciona con la frecuencia de vibración natural de cada una de las uniones presentes en las moléculas y, por lo tanto, pueden identificarse varios tipos de uniones, así como también grupos funcionales. Los espectros FTIR están conformados por dos zonas: una de grupos funcionales (4000-1300 cm^{-1}) y otra “fingerprint” o “huella digital” que comprende longitudes de onda entre 1300 y 600 cm^{-1} . La región de grupos funcionales se usa para identificar tipo y carga de los grupos, mientras que la región de la “huella

digital” indica las características estructurales propia de la molécula. Los espectros superpuestos con diferentes proporciones de CaCl_2 (0; 0,3; 1,2 y 2,0 mmol) por g de CMP se muestran en la **Figura 2**. El espectro FTIR del CMP (ver concentración de CaCl_2 cero) fue similar al obtenido por Burgardt et al. (2015), quienes utilizaron un producto comercial del mismo proveedor. Se puede observar una banda ancha e intensa entre 3400 y 3300 cm^{-1} relacionada a un solapamiento de bandas correspondientes a la vibración de los estiramientos O–H, libre o unido (Burgardt et al. 2014). Las absorciones de tensión N–H tienen lugar a frecuencias ligeramente más bajas que las absorciones de tensión del O–H. Las bandas de las amidas secundarias A y B se encuentran a 3300 cm^{-1} y 3080 cm^{-1} , respectivamente (Burgardt et al. 2014). La banda de la amida A corresponde al estiramiento del enlace N–H en la formación de la unión puente hidrógeno N–H mientras que la amida B resulta de la resonancia de FERMI de la vibración del estiramiento N–H con el sobretono de la vibración de la amida II (Twardowski et al. 1994). Según Burgardt et al. (2014) estas bandas también están relacionadas con el aminoácido prolina, que es abundante en el CMP. Las bandas observadas en 2970 y 2940 cm^{-1} refieren a vibraciones simétricas y asimétricas del grupo metilo ($-\text{CH}_3$) (Abraham et al. 2008). La vibración de la amida I, que es causada principalmente por los estiramientos del enlace $\text{C}=\text{O}$, se mide en el rango de 1700 a 1600 cm^{-1} , mientras que, la vibración de la amida II, que se produce por la deformación de los enlaces N–H y por los estiramientos de los enlaces C–N, se mide en el rango de 1600 a 1500 cm^{-1} (Curley 1998). Estos son los modos vibracionales más importantes de las amidas. Las frecuencias exactas a las que estos enlaces absorben dependen de la estructura secundaria de las proteínas o péptidos. En el espectro del CMP estas bandas se observan en 1649 cm^{-1} y 1549 cm^{-1} , y se atribuyen a las vibraciones de amida I y II respectivamente. La banda de amida III a 1240 cm^{-1} representa la combinación entre la vibración del estiramiento C–N, la flexión del enlace N–H de la amida y las vibraciones de los grupos CH_2 del esqueleto de la glicina y de las cadenas laterales de la prolina (Jackson 1995). Una de las bandas especialmente significativas en el CMP es la correspondiente al grupo funcional carboxilato (COO^-). Los carboxilatos producen una vibración a los 1400 cm^{-1} que caracteriza la coordinación de los iones metálicos divalentes (Nara 2008). La banda a 1320 cm^{-1} es atribuida al grupo CO–N (amina) (Burgardt et al. 2014). El CMP está glicosilado, y la señal de absorción en la región de la huella digital se encuentra entre 1200 y 1000 cm^{-1} (Khajehpour et al. 2006). Según Lewis et al. (2013) el ácido siálico

tiene una señal característica a 1024 cm^{-1} , la N-Acetilglucosamina (GlcNAc) a 1025 cm^{-1} y la N-Acetilgalactosamina (GalNAc) a 1038 cm^{-1} . Los sitios fosforilados del CMP (Ser 149 y 127) dan una escasa señal a 990 cm^{-1} (Carmona et al. 1986). Las bandas presentes a 935 y 900 cm^{-1} estarían relacionadas con la galactosa (Burgardt y col., 2014).

Al comparar los espectros (con y sin CaCl_2) se distinguen diferencias que brindan información acerca de la estructura molecular. Puede apreciarse en la misma **Figura 2** que los principales cambios en los espectros se detectaron cuando la relación de CaCl_2/CMP fue igual o superior a 1,2 mmoles de $\text{CaCl}_2/\text{g CMP}$. Se distinguieron diferencias que brindaron información en la estructura molecular, por ejemplo, desplazamientos hacia el rojo o hacia el azul, incremento o reducción de picos. La absorción a alta frecuencia de 3301 cm^{-1} (Amida 2° A) que se atribuye a la vibración de estiramientos N-H cambió a 3283 cm^{-1} y el de la Amida 2° B de 3080 a 3088 cm^{-1} . Este cambio podría deberse a que los grupos N-H se reemplazarían por uniones N-Ca como describieron Peng et al. (2017) y Wang et al. (2017) para otros péptidos. La banda de Amida I a 1649 cm^{-1} para los espectros con CaCl_2/CMP , se debería a que los grupos C-O participarían en la interacción del péptido con el Ca^{2+} (Wu et al. 2019). En la región de la Amida II han desaparecido los picos correspondientes al número de onda 1535 y 1545 cm^{-1} , encontrándose un valle en el espectro del CMP/CaCl_2 .

Fundamentalmente, el cambio más relevante se observa en la banda correspondiente a la vibración de los grupos carboxílicos (COO^-), donde el pico hallado se desplazó desde 1400 cm^{-1} hacia frecuencias mayores (1416 cm^{-1}) en el espectro del CMP/CaCl_2 . Este efecto puede ser atribuido a la extensión de los grupos $-\text{COO}^-$ que se combinan con Ca^{2+} para formar $\text{COO}-\text{Ca}$ (Byler et al. 1989, Wang et al. 2017). Wang et al. (2017) estudiaron a través de espectroscopía FTIR el efecto de la interacción del CaCl_2 y un péptido proveniente de la fermentación con *B. subtilis* de semillas de pepino. Los autores observaron un desplazamiento desde 1402 cm^{-1} en el espectro del péptido libre hacia frecuencias mayores (1420 cm^{-1}) en presencia de calcio y lo atribuyeron al estiramiento del grupo carboxilato $-\text{COO}^-$ por la combinación con Ca^{2+} para formar $-\text{COO}-\text{Ca}$.

Determinación de la fracción no dializable de calcio

La capacidad ligante de calcio del CMP también se evaluó por la metodología clásica de cuantificar la fracción no dializable de calcio. Esta fracción es aquella que se

encuentra ligada al CMP y por ello no puede atravesar la membrana de diálisis. Durante las primeras horas del ensayo, la concentración de calcio dentro de la bolsa de diálisis decreció rápidamente, hasta alcanzar el equilibrio (24 h). El rápido decrecimiento de la fracción de calcio en los primeros momentos se debe a la fácil difusión de los iones a través de la membrana semipermeable, que no puede ser atravesada por el CMP. Los iones calcio difunden debido a la diferencia de potencial químico entre la solución del interior de la bolsa y el agua del exterior. Dado el impacto de la fuerza iónica en el estado de asociación del CMP, se eligió dializar la muestra contra agua ultrapura a pH 7 y no contra una solución buffer Tris-HCl como se usa en la bibliografía (Bennick 1976, Bao et al. 2007). La fracción de calcio que no atravesó la membrana de diálisis (calcio retenido en la bolsa de diálisis junto al CMP) fue del $64,4 \pm 3,3 \%$ y representó el calcio unido al CMP (a pH neutro y temperatura ambiente) que se estimó que $1,3 \pm 0,1$ milimoles de CaCl_2 por gramo de CMP, equivalente a aprox. 9-10 moles de Ca^{2+} por mol de CMP.

Calcio unido y constantes de asociación.

La constante de asociación aparente (K_{ap}), el máximo calcio unido por mg de CMP (n_i) y el número de sitios de unión se determinaron a través de un ajuste de los datos experimentales al modelo teórico de Berrocal et al. (1989). En una situación ideal se consigue una recta a partir de la cual se puede calcular la constante de asociación aparente y la cantidad máxima de moles de calcio unidos (Berrocal et al. 1989, Jung et al. 2006, Zong et al. 2012). La **Figura 3** muestra los gráficos de Klotz obtenidos al representar la inversa del calcio unido (Ca_U) vs la inversa del calcio libre (Ca_L) según la **Ecuación 1**, para las tres condiciones de pH evaluadas (7,0; 8,0 y 9,0). Se pueden distinguir el ajuste matemático para dos a tres rectas, todas de $R^2 > 0,917$, demostrando que son varios los sitios en la molécula de CMP que pueden unir Ca^{2+} . Zhang et al. (2016) reconocieron dos rectas en los diagramas de Klotz y las adjudicaron a dos maneras diferentes en los que la molécula fosfotitina se une al calcio, interaccionando con sitios de baja y alta afinidad. También Lee et al. (1977) reconocieron dos rectas para una fosfoproteína de la dentina. Cuando la concentración de calcio libre es baja, la interacciones entre el calcio y un péptido se dan en sitios de alta afinidad, y al contrario, si la concentración de calcio libre es lo suficientemente alta, podrán interaccionar los sitios más débiles, de baja afinidad.

Los moles de máximo Ca^{2+} unido expresados por mol de CMP (n_i) y los valores de K_{ap} obtenidos del ajuste matemático de los datos en la condición de bajo calcio libre (sitio de alta afinidad) se muestran en la **Tabla 1**. Para los cálculos se consideró una masa molecular promedio para el CMP de 7500 Da (Mollé et al. 2005). Los resultados mostraron que la cantidad obtenida de calcio unido fue independiente del pH, siendo este valor cercano a 1 mol de Ca^{2+} por mol de CMP, que correspondería a un sitio de alta afinidad con el calcio, quizá relacionado con el contenido de fósforo de la molécula según lo descrito por Berrocal et al. (1989) para fosfopéptidos. Para el caso del CMP, el residuo de Ser en posición 44 se encuentra siempre fosforilado (Mercier et al. 1993). La **Tabla 1** revela que los valores de K_{ap} de aproximadamente $2 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ no dependieron del pH reforzando la hipótesis de que el sitio de alta afinidad está fuertemente ionizado en los tres pH estudiados. Zhang et al. (2016) determinaron una K_{ap} para el sitio de alta afinidad de la fosfovítina de aprox. 10^4 L mol^{-1} independiente del pH entre 7 y 8 usando la misma técnica. Lee et al. (1977) también encontraron una K_{ap} más alta ($3,6 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1}$) para el sitio de alta afinidad de una fosfoproteína obtenida de la dentina bovina.

En la **Tabla 2**, se muestran los valores de n_i y K_{ap} en condiciones de alto calcio libre. Se encontró que la cantidad máxima de calcio unido aumentó con el crecimiento del pH desde 7 a 9. Así, un mol de CMP unió entre 8 y 14 moles de calcio. Esto sugiere que los grupos carboxilatos (residuos de glutamato y aspártico) estarían también involucrados en la unión con el calcio del CMP más allá algún residuo de Ser fosforilado. Entre los aminoácidos, el aspártico y el glutámico son fuertes ligantes de calcio, aunque débiles en comparación a otros aniones. No obstante, el efecto sinérgico es evidente tal como describieron Vavrusova et al. (2014) para otros polipéptidos. Por otro lado, si bien el número de moles de Ca^{2+} que incorporó el CMP aumentó con el pH, la K_{ap} tuvo el efecto opuesto al esperado disminuyeron desde 132 L mol^{-1} (pH 7) a 33 L mol^{-1} (pH 9). También Lee et al. (1977) hallaron una K_{ap} para los sitios de baja afinidad que fue dos órdenes de magnitud inferior que en los sitios de alta afinidad de una fosfoproteína de la dentina bovina.

No solamente la Ser fosforilada y los grupos carboxilatos podrían interaccionar con el calcio. Considerando una masa molecular de ácido siálico de 309 g/mol, se puede estimar que un mol de CMP proporcionaría entre 1,2 y 2,7 moles de ácido siálico. Como el complejo formado por la unión entre el siálico y calcio es 1:1 (Jaques et al. 1977), cada mol de CMP puede unir entre 1 y 3 moles de calcio solamente por la

presencia de siálico. Por ello, el grado de glicosilación del CMP no es un dato menor si se desea analizar su capacidad ligante de calcio. En resumen, considerando todos los posibles sitios de interacción el CMP puede llegar a unir hipotéticamente entre 11 y 14 moles de calcio por mol, un dato similar al obtenido en este ensayo (**Tabla 1** y **Tabla 2**).

Conclusiones

Se concluye mediante diferentes técnicas que efectivamente el CMP tiene capacidad ligante de calcio a pH neutro. A pH 7,0, el CMP se encuentra formando moléculas individuales (monómeros), pero si se adiciona CaCl_2 , las cargas electroestáticas se apantallan y los residuos hidrofóbicos de la molécula de CMP pueden interaccionar. Los resultados de DLS indicaron que cuando la concentración de cloruro de calcio es superior a una relación 9-10 moles CaCl_2 por mol de CMP, se alcanza el máximo estado de asociación, un hexámero. Este cambio en el tamaño es indicativo de una interacción molecular con el CaCl_2 . En condiciones de bajo calcio libre un mol de CMP une fuertemente 1 mol de calcio, independientemente del pH. En las condiciones de alto calcio libre un mol de CMP une (más débilmente) al calcio, con un valor mínimo de 8 moles a pH 7 y máximo de 14 moles de calcio a pH 9. Los espectros FTIR de CMP/CaCl_2 confirmaron que en presencia de calcio iónico se evidencia principalmente un corrimiento en la posición de los grupos carboxilatos (COO^-) desde 1400 cm^{-1} a 1416 cm^{-1} que indicarían interacción para la misma relación. Este trabajo demuestra una nueva propiedad del CMP con alto valor agregado.

Agradecimientos

A la Dra. Ana Pilosof y Bioq. Andrés Pighín. Los autores desean agradecer al departamento de Tecnología de la Universidad Nacional de Luján, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina (Proyecto PICT-2014-1402), a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Figura 1

Valor máximo del $d(H)$ del primer pico de la distribución (intensidades) de soluciones de CMP en función de concentraciones crecientes de CaCl_2 a pH 7 y 25 °C. Concentración de CMP: **A)** 10 g/L y **B)** 50 g/L. Se indica el estado de asociación predominante estimado mediante el software del equipo Zetasizer Nano-Zs. Las barras representan el desvío estándar.

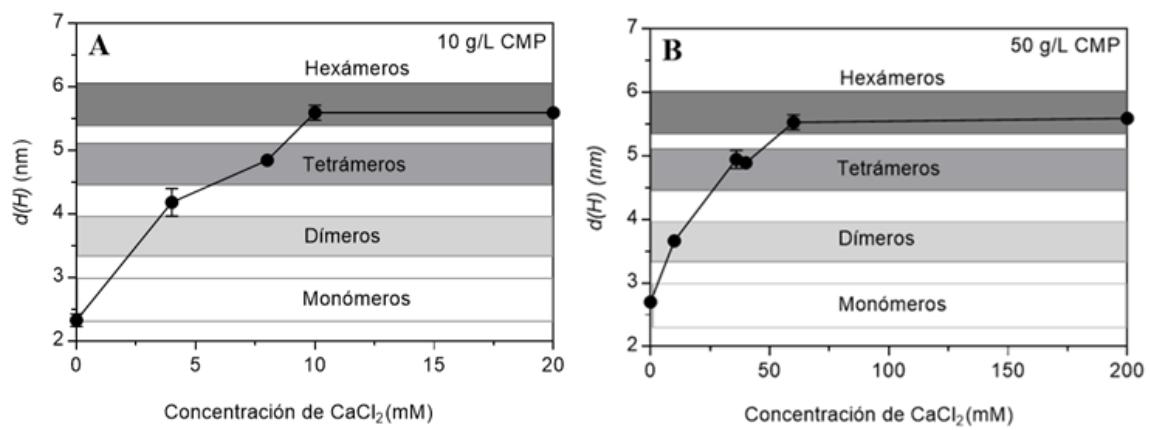


Figura 2. Espectro FTIR del CMP con diferentes relaciones CaCl_2/CMP , desde 4000 a 500 cm^{-1} .

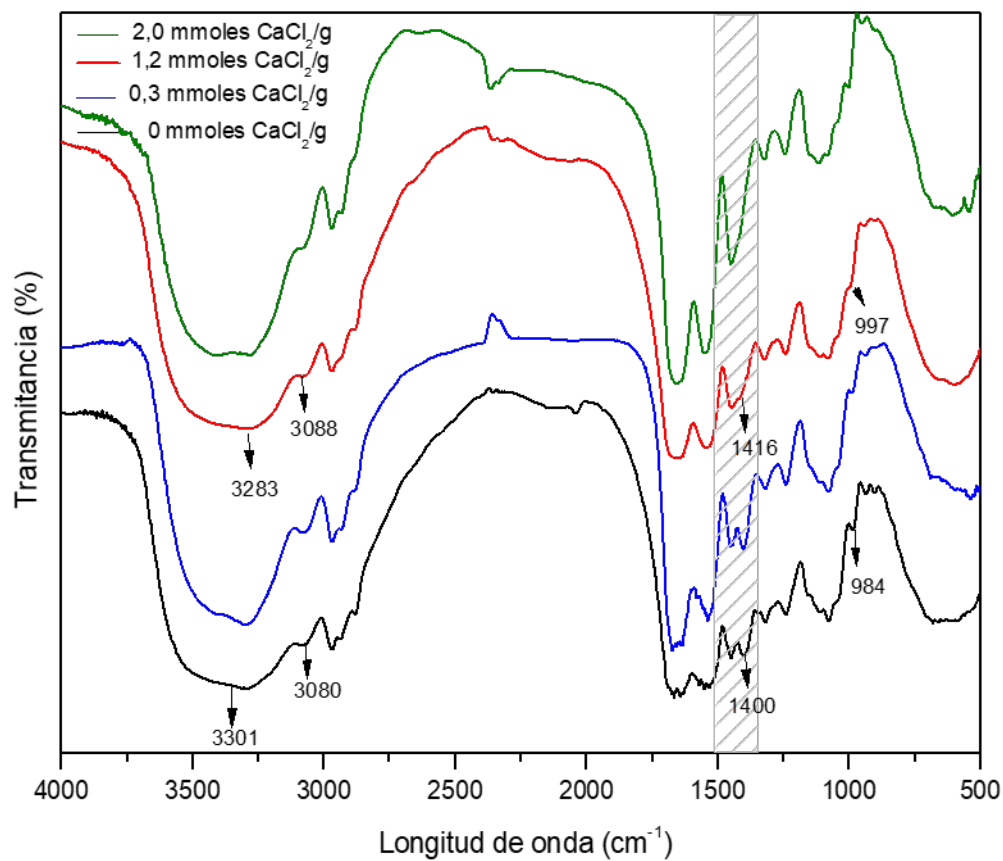


Figura 3. Gráficos de Klotz del sistema Ca/CMP a **A)** pH 7, **B)** pH 8 y **C)** pH 9 con una fuerza iónica de 0,05 M (KCl) y 25°C, asumiendo una masa molecular promedio para el CMP de 7500 Da.

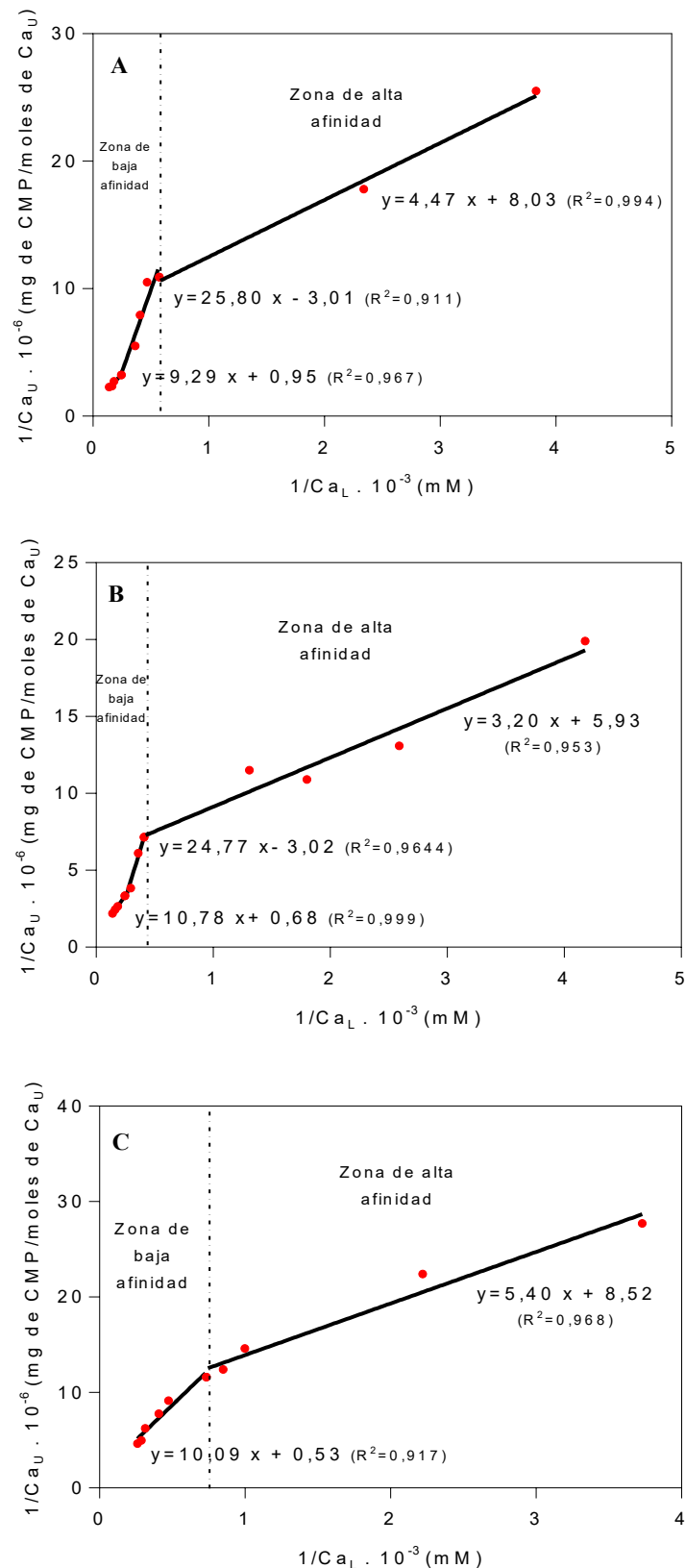


Tabla 1. K_{ap} y n_i en condiciones de bajo calcio libre obtenidos del gráfico de Klotz. Se asumió una masa molecular promedio para el CMP de 7500 Da.

pH	7	8	9
K_{ap} (L mol⁻¹)	1700 ± 300 ^a	2200 ± 300 ^a	1600 ± 50 ^a
n_i (moles de Ca²⁺/mol de CMP)	0,93 ± 0,04 ^a	1,26 ± 0,21 ^a	0,87 ± 0,12 ^a

Letras diferentes representan diferencias significativas a $p > 0,05$.

Tabla 2. K_{ap} y n_i en condiciones de alto calcio libre obtenidos del gráfico de Klotz. Se asumió una masa molecular promedio para el CMP de 7500 Da.

pH	7	8	9
K_{ap} (L mol⁻¹)	132 ± 30 ^a	63 ± 1 ^{a, b}	33 ± 1 ^b
n_i (moles de Ca²⁺/mol de CMP)	7,9 ± 1,8 ^a	11,0 ± 0,48 ^a	14,0 ± 0,6 ^a

Letras diferentes representan diferencias significativas a $p > 0,05$.

Bibliografía

- Abraham, J. P., D. Sajan, I. H. Joe and V. S. Jayakumar (2008). "Molecular structure, spectroscopic studies and first-order molecular hyperpolarizabilities of p-amino acetanilide." Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc **71**(2): 355-367.
- Bao, X. L., M. Song, J. Zhang, Y. Chen and S. T. Guo (2007). "Calcium-binding ability of soy protein hydrolysates." Chinese Chemical Letters **18**(9): 1115-1118.
- Bennick, A. (1976). "The binding of calcium to a salivary phosphoprotein, protein A, common to human parotid and submandibular secretions." Biochemical Journal **155**(1): 163-169.
- Berrocal, R., S. Chanton, M. A. Juillerat, B. Favillare, J.-C. Scherz and R. Jost (1989). "Tryptic phosphopeptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium." Journal of Dairy Research **56**(3): 335-341.
- Berrocal, R., C. Serge, J. M. A., Favillare Blaise, S. Jean-Claude and J. Rolf (1989). "Tryptic phosphopeptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium." Journal of Dairy Research **56**(3): 335-341.
- Brody, E. P. (2000). "Biological activities of bovine glycomacropeptide." British Journal of Nutrition **84**(SupplementS1): 39-46.
- Burgardt, V. C. F., D. F. Oliveira, I. G. Evseev, A. R. Coelho, C. W. I. Haminiuk and N. Waszczynskyj (2014). "Influence of concentration and pH in caseinomacropeptide and carboxymethylcellulose interaction." Food Hydrocolloids **35**: 170-180.
- Burgardt, V. C. F., L. C. B. Züge, G. de Bonna Sartor, N. Waszczynskyj, J. L. M. Silveira and C. W. I. Haminiuk (2015). "The addition of carboxymethylcellulose in caseinomacropeptide acid gels: Rheological, optical and microstructural characteristics." Food Hydrocolloids **49**(0): 11-17.
- Byler, D. M. and H. M. Farrell, Jr. (1989). "Infrared Spectroscopic Evidence for Calcium Ion Interaction with Carboxylate Groups of Casein." Journal of Dairy Science **72**(7): 1719-1723.
- Carmona, P. and M. L. Rodriguez (1986). "Hydrogen bonding between phosphate and amino acid side chains." Journal of Molecular Structure **143**: 365-368.
- Chen, M., H. Ji, Z. Zhang, X. Zeng, W. Su and S. Liu (2019). "A novel calcium-chelating peptide purified from Auxis thazard protein hydrolysate and its binding properties with calcium." Journal of Functional Foods **60**: 103447.
- Choi, D. W., Lee, J. H., Chun, H. H., & Song, K. B (2012). "Isolation of a calcium-binding peptide from bovine serum protein hydrolysates." Food Science and Biotechnology **21**(6): 1663-1667.
- Curley, D. K., T.; Unrah, J.; Farrell, H. (1998). "Changes in the secondary structure of bovine casein by Fourier transform infrared spectroscopy: effects of calcium and temperature." J. Dairy Sci. **81**: 3154-3162.
- Dziuba, J. and P. Minkiewicz (1996). "Influence of glycosylation on micelle-stabilizing ability and biological properties of C-terminal fragments of cow's κ -casein." International Dairy Journal **6**(11-12): 1017-1044.
- El-Salam, M. H. A., S. El-Shibiny and W. Buchheim (1996). "Characteristics and potential uses of the casein macropeptide." International Dairy Journal **6**(4): 327-341.
- FAO (2001). "Human Vitamin and Mineral Requirements, Report 07a." Joint FAO/OMS Expert Consultation. Bangkok, Thailand.
- Farías, M. E., M. J. Martinez and A. M. R. Pilosof (2010). "Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation." International Dairy Journal **20**: 79-88.
- Fernando, S. F. and B. W. Woonton (2010). "Quantitation of N-acetylneuraminic (sialic) acid in bovine glycomacropeptide (GMP)." Journal of Food Composition and Analysis **23**(4): 359-366.
- Hou, H., S. Wang, X. Zhu, Q. Li, Y. Fan, D. Cheng and B. Li (2018). "A novel calcium-binding peptide from Antarctic krill protein hydrolysates and identification of binding sites of calcium-peptide complex." Food Chemistry **243**: 389-395.

- Jackson, M., Choo, L. P., Watson, P. H., Halliday, W. C., & Mantsch, H. H. (1995). "Beware of connective tissue proteins: assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues." *Biochimica et Biophysica Acta e Molecular Basis of Disease* **1270**: 1-6.
- Jaques, L. W., E. B. Brown, J. M. Barrett, W. S. Brey and W. Weltner (1977). "Sialic Acid: A calcium-binding carbohydrate." *The Journal of Biological Chemistry* **252**, Nº **13**: 4533-4538.
- Jung, W.-K., R. Karawita, S.-J. Heo, B.-J. Lee, S.-K. Kim and Y.-J. Jeon (2006). "Recovery of a novel Ca-binding peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis." *Process Biochemistry* **41**(9): 2097-2100.
- Kawasaki, Y., H. Kawakami, M. Tanimoto, S. Dosako, A. Tomizawa, M. Kotake and I. Nakajima (1993). "pH-Dependent molecular weight changes of κ -casein glycomacropeptide and its preparation by ultrafiltration." *Milchwissenschaft* **48**: 191-196.
- Khajehpour, M., J. L. Dashnau and J. M. Vanderkooi (2006). "Infrared spectroscopy used to evaluate glycosylation of proteins." *Analytical Biochemistry* **348**(1): 40-48.
- Korhonen, H. and A. Pihlanto (2006). "Bioactive peptides: Production and functionality." *International Dairy Journal* **16**(9): 945-960.
- Kreuz, M., T. Strixner and U. Kulozik (2009). "The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinomacropeptide." *Food Hydrocolloids* **23**(7): 1818-1826.
- Lee, S. L., A. Veis and T. Glonek (1977). "Dentin phosphoprotein: an extracellular calcium-binding protein." *Biochemistry* **16**(13): 2971-2979.
- Lewis, S. P., A. T. Lewis and P. D. Lewis (2013). "Prediction of glycoprotein secondary structure using ATR-FTIR." *Vibrational Spectroscopy* **69**: 21-29.
- Loria, K. G., A. M. R. Pilosof and M. E. Fariás (2018). "Influence of calcium and sodium chloride on caseinomacropeptide self-assembly and flow behaviour at neutral pH." *LWT* **98**: 598-605.
- Martinez, M. J., M. E. Fariás and A. M. R. Pilosof (2011). "Casein glycomacropeptide pH-driven self-assembly and gelation upon heating." *Food Hydrocolloids* **25**(5): 860-867.
- Mercier, J.-C. and J.-L. Vilotte (1993). "Structure and Function of Milk Protein Genes." *Journal of Dairy Science* **76**(10): 3079-3098.
- Mollé, D. and J. Léonil (2005). "Quantitative determination of bovine κ -casein macropeptide in dairy products by Liquid chromatography/Electrospray coupled to mass spectrometry (LC-ESI/MS) and Liquid chromatography/Electrospray coupled to tandem mass spectrometry (LC-ESI/MS/MS)." *International Dairy Journal* **15**(5): 419-428.
- Morales, R., M. J. Martinez and A. M. R. Pilosof (2019). "pH-induced cold gelation of caseinglycomacropeptide emulsions." *Food Hydrocolloids* **87**: 805-813.
- Nara, M. a. T., Masaru (2008). "Infrared spectroscopic study of the metal-coordination structures of calcium-binding proteins." *Biochemical and Biophysical Research Communication* **369**: 225-239.
- Ney, D. M., A. K. Hull, S. C. van Calcar, X. Liu and M. R. Etzel (2008). "Dietary Glycomacropeptide supports growth and reduces the concentrations of phenylalanine in plasma and brain in a murine model of phenylketonuria." *J. Nutr.* **138**(2): 316-322.
- Peng, Z., H. Hou, K. Zhang and B. Li (2017). "Effect of calcium-binding peptide from Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) bone on calcium bioavailability in rats." *Food Chemistry* **221**: 373-378.
- Thomä-Worringer, C., J. Sørensen and R. López-Fandiño (2006). "Health effects and technological features of caseinomacropeptide." *International Dairy Journal* **16**(11): 1324-1333.
- Tuan, R. S., Scott, W. A., & Cohn, Z. A. (1987). "Purification and characterization of calcium-binding protein from chick chorioallantoic membrane." *Journal of Biological Chemistry* **253**(4): 1011-1016.
- Twardowski, J. and P. Anzenbacher (1994). *Raman and IR spectroscopy in biology and biochemistry / J. Twardowski, P. Anzenbacher ; translation editor, Mary Masson*. New York : Warsaw, Ellis Horwood ; Polish Scientific Publishers.
- Vavrusova, M. and L. H. Skibsted (2014). "Calcium nutrition. Bioavailability and fortification." *LWT - Food Science and Technology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.034>.
- Wang, L., Y. Ding, X. Zhang, Y. Li, R. Wang, X. Luo, Y. Li, J. Li and Z. Chen (2018). "Isolation of a novel calcium-binding peptide from wheat germ protein hydrolysates and the prediction for its mechanism of combination." *Food Chemistry* **239**: 416-426.

- Wang, X., A. Gao, Y. Chen, X. Zhang, S. Li and Y. Chen (2017). "Preparation of cucumber seed peptide-calcium chelate by liquid state fermentation and its characterization." Food Chemistry **229**: 487-494.
- Wu, W., L. He, Y. Liang, L. Yue, W. Peng, G. Jin and M. Ma (2019). "Preparation process optimization of pig bone collagen peptide-calcium chelate using response surface methodology and its structural characterization and stability analysis." Food Chemistry **284**: 80-89.
- Wu, W., B. Li, H. Hou, H. Zhang and X. Zhao (2017). "Isolation and identification of calcium-chelating peptides from Pacific cod skin gelatin and their binding properties with calcium." Food & Function **8**(12): 4441-4448.
- Zhang, X., F. Geng, X. Huang and M. Ma (2016). "Calcium binding characteristics and structural changes of phosvitin." Journal of Inorganic Biochemistry **159**: 76-81.
- Zhao, L., S. Huang, X. Cai, J. Hong and S. Wang (2014). "A specific peptide with calcium chelating capacity isolated from whey protein hydrolysate." Journal of Functional Foods **10**: 46-53.
- Zong, H., L. Peng, S. Zhang, Y. Lin and F. Feng (2012). "Effects of molecular structure on the calcium-binding properties of phosphopeptides." European Food Research and Technology **235**(5): 811-816.

Aspectos funcionales y nutricionales de harinas comerciales orgánicas de trigos ancestrales (*Triticum spelta*) y Trigo Pan (*Triticum aestivum* L.) en Argentina

Ormando, P.^{3,4,5}; Mir, L.²; Di Pane, F.¹; Molfese; E.¹

Correspondencia: molfese.elenarosa@inta.gob.ar

1. Chacra Experimental Integrada Barrow. Grupo Mejoramiento y Calidad (Convenio MDA–INTA) C.C. 50-7500-Tres Arroyos, Pcia. Buenos Aires, Argentina. 2. Estación Experimental A. EEA, Marcos Juárez. Córdoba, Argentina. 3. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto Tecnología de Alimentos. Argentina. 4. Instituto de Ciencia y Tecnología de Sistemas Alimentarios Sustentables, UEDD INTA CONICET. Argentina. 5. Universidad Argentina de la Empresa (UADE). Instituto de Tecnología (INTEC). Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

La valorización del consumo de productos elaborados a partir de harinas de trigos ancestrales como el Espelta está aumentando en el mundo. Su cultivo se efectúa de manera sustentable y se asocia con dietas saludables. Particularmente en Argentina, la producción se realiza de manera orgánica.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento de dos harinas integrales comerciales de trigo Espelta (*Triticum spelta*), comparando su performance respecto de una harina integral de Trigo pan (*Triticum aestivum*) de alta calidad industrial.

Se determinó composición nutricional y se caracterizó las propiedades reológicas mediante el análisis del gluten, farinograma, alveograma, mixolab, entre otros, además de ensayos de panificación y elaboración de galletitas.

Las harinas de Espelta presentaron diferencias entre sí y respecto del Trigo Pan en: granulometría, cenizas, fósforo, sodio, hierro, grasa, fibra, color, fuerza panadera, actividad amilásica, calidad galletitera.

Se corroboró que las harinas integrales de Espelta forman gluten y su contenido así como el de proteína, fue mayor al del Trigo Pan. Sin embargo las masas fueron más débiles y con menor fuerza panadera.

No se evidenciaron diferencias en el volumen de panes elaborados probablemente debido a la metodología utilizada.

Este estudio mostró que las harinas integrales de espelta comercializadas en nuestro país poseen características diferenciales en calidad nutricional, aptitud y potencial para la elaboración de productos, presentándose como una alternativa válida al momento de diversificar las dietas.

La difusión de la información generada podría ser un estímulo para el cultivo y para los elaboradores de productos a partir de harina de espelta.

1. Introducción y Objetivos

1.1 Origen del *Triticum Spelta*

El trigo es utilizado como una fuente de alimentación básica desde la edad de piedra (6700 a.C) y cultivado desde aproximadamente 5000 a.C. Las variedades del trigo moderno (*Triticum aestivum*) han evolucionado por diferenciación genómica a partir de tres granos ancestrales y por cruzamientos con trigos silvestres. Las tres especies originales actualmente referidas como granos antiguos son Espelta (*Triticum spelta*), Farro (*Triticum dicoccum*) y Escanda o Escaña (*Triticum monococcum*), Collar, (2007).

Como trigo tetraploide se menciona la especie silvestre *T. turgidum ssp. dicoccoides* L. (AABB). La domesticación de este trigo tetraploide silvestre dio lugar a *T. turgidum ssp. dicoccum*, del que evolucionaron posteriormente otras subespecies de trigos. El espelta ($2n=6x=42$; AABBDD) *T. aestivum ssp. spelta* L. em Thell.) es el trigo hexaploide primitivo del que habría evolucionado el trigo harinero moderno (*T. aestivum ssp. aestivum* L. em. Thell). Este trigo se habría producido por el cruzamiento espontáneo entre *T. turgidum ssp. dicoccum* y *Ae. tauschii ssp. strangulata* Coss. Cuando se sintetiza artificialmente el *T. aestivum* por cruzamiento entre *T. turgidum* y *Ae. tauschii* el producto resultante es un trigo vestido como el espelta, Caballero García, (2005).

La domesticación de cultivos se asocia con la selección de rasgos genéticos que pueden incluir cambios, por ejemplo, que llevan a la obtención de granos descascarados. En los cereales antiguos las glumas de la flor se adhieren firmemente al grano. Debido a que el carácter de trilla libre se encuentra condicionado y está controlado por mutaciones en solo dos loci genéticos (Dubcovsky y Dvorak, 2007), el trigo y la espelta se consideran formas de la misma especie (*Triticum aestivum*). El trigo panadero y el trigo espelta son realmente la misma especie, resultante de la combinación de muchos tipos modernos de espelta que contienen material genético desde el trigo panadero, el cual ha sido incorporado para mejorar su producción, (Shewry, 2018).

En la Tabla N°1 se presenta el nombre común, científico y los genomas de los trigos actuales.

Tabla N° 1: Trigos actuales con su nombre común, científico y los genomas

Nombre común	Nombre científico	Genoma
Wheat (bread)	<i>Triticum aestivum</i>	AA BB DD
Durum (pasta) wheat	<i>Triticum turgidum var durum</i>	AA BB
Spelt	<i>Triticum aestivum var spelta</i>	AA BB DD
Emmer	<i>Triticum turgidum var diccum</i>	AA BB
Kamut	<i>Triticum turgidum, ssp. turanicum</i>	AA BB

Fuente: (Marsh, 2000)

1.2. Cereales en el mundo

El trigo y su harina representan el alimento básico para el 40% de la población mundial y ha sido fundamental en la historia humana, puesto que es utilizado por millones de comunidades. No solo se emplea como materia prima, en

forma de granos, sino que también se consume a través de uno de sus derivados más inmediatos: la harina (FAO, 2018).

Los cereales como Escanda, Farro y Espelta continúan produciéndose en pequeñas cantidades en algunas regiones de Europa y de América del Norte. Actualmente en España, por ejemplo, el cultivo se mantiene ligado a la zona de Asturias. Además, las especies de trigos antiguos han sido reintroducidos en la agricultura ecológica. Existe un interés creciente en identificar especies de trigo con mayor potencial para la salud, más específicamente para mejorar las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Este interés podría contribuir al estudio de las enfermedades crónicas relacionadas con la dieta. En un trabajo de Dinu y col., 2018, se menciona que el perfil nutricional de las variedades antiguas es “más saludable” respecto a los trigos modernos.

El trigo espelta se diferencia del trigo pan y candeal en aspectos tales como la apariencia física del grano y las propiedades nutritivas, Collar (2007). Los trigos ancestrales poseen granos vestidos que le confieren resistencia a plagas y enfermedades. La presencia de ese “grano vestido” tiene como ventaja la resistencia al ataque de patógenos y también la infección, por ejemplo del hongo *Fusarium*, que puede atacar al grano sintetizando micotoxinas, entre ellas el DON (deoxinilivalenol) cuya presencia puede tener consecuencias nocivas para la salud, (Konvalina et al, 2005). La barrera física del grano vestido otorgaría protección ante algunos patógenos, posibilitando la obtención de harinas integrales con potencial nutricional, garantizando su inocuidad alimentaria y adaptable a una agricultura sostenible.

En general las posibilidades de utilización de las tres especies originales Espelta, Farro y Escanda (España) son: productos panificados, galletitas, mezclas para sopas, fideos, cereales para desayuno, cerveza y sémola.

1.3 Producción de trigo y harina en Argentina

Nuestro país es uno de los principales productores mundiales de trigo, con un volumen anual que supera las 18 millones de toneladas donde una tercera parte se destina a la molienda. De acuerdo al último reporte de la Cadena de Trigo, el consumo de harina de trigo pan en el 2017 fue de 77,7 kg/habitante. El trigo candeal aporta anualmente cerca de 300.000 toneladas y la sémola que se obtiene, insumo básico para la industria fideera, es prácticamente utilizada en su totalidad en el mercado interno.

En el caso del trigo Espeltano existen cifras oficiales en cuanto a hectáreas sembradas, producción ni consumo. Ante el INASE (Instituto Nacional de Semillas) se encuentran registradas dos variedades de *Triticum espelta*: Dinkel ECOFAUNO, variedad argentina que se inscribió en el año 2008 y OberKulmer ROTKORN, una introducción europea registrada a principios del siglo XX en Suiza, cuya inscripción se realizó en el 2018 en Argentina.

Los obtentores son los encargados de producir y comercializar las harinas integrales que se encuentran en el mercado. La producción se realiza en condiciones de agricultura orgánica certificada, de acuerdo a lo declarado por sus comercializadores. Estas harinas integrales se venden en ferias, dietéticas, *e-commerce* y mercados artesanales con mucho éxito.

La relevancia que el cultivo está adquiriendo se manifiesta en el pedido que el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) realizó sobre la incorporación del Trigo Espelta al Código Alimentario Argentino. Así, desde el 2017 el Ministerio de Agroindustria de la Nación lo incorporó en el

Código Alimentario Argentino y lo define en el Capítulo IX ('Farináceos-cereales, harinas y derivados') Artículo 657 tris – (Resolución Conjunta SPRel y SAV N° 7 - E/2017): “Se entiende por Trigo Espelta (Dinkel, Escaña, Espelta) a la semilla sana, limpia y bien conservada de distintas variedades de *Triticum spelta* L.”

En el Laboratorio de Calidad Industrial de Barrow (MDA-INTA) desde hace varios años se realizan pruebas con el fin de evaluar distintos aspectos de la calidad funcional y el comportamiento en la panificación de este cereal antiguo (Molfese & Di Pane, 2019). En el último tiempo, tanto productores como profesionales asociados a la agricultura e incluso desde el área comercial de la embajada argentina han consultado ante INTA sobre las posibilidades de siembra, producción y aspectos de comercialización de este trigo. Existe un marcado interés desde el ámbito académico para estudiar y presentar resultados vinculados a aspectos nutricionales como el contenido de fibra, proteínas, minerales y vitaminas.

Actualmente, los autores de este estudio trabajan con el fin de caracterizar el perfil nutricional, reológico y sensorial de alimentos con énfasis en el agregado de valor que poseen los productos elaborados con harinas integrales provenientes de trigo Espelta asociados a diversos sistemas de producción agropecuaria. El Proyecto Estructural (PE I517) corresponde a la nueva cartera de proyectos aprobados por INTA donde además se prioriza el agregado de valor en la producción agropecuaria/agroalimentaria a través de la mejora, identidad y/o transformación de producto y oportunidad de su comercialización.

El objetivo de este trabajo fue evaluar las características tecnológicas y el comportamiento de dos harinas integrales comerciales de trigo Espelta (*Triticum spelta*) de nuestro país, comparando su performance respecto de una harina integral de Trigo pan (*Triticum aestivum*) de alta calidad industrial generando información para la comunidad.

2. Materiales y Métodos

Las dos harinas integrales orgánicas utilizadas de Trigo Espelta (*Triticum spelta*) son las únicas que se encuentran presentes en el mercado argentino.

Cada una de ellas corresponde a una variedad específica (Dinkel ECOFAUNO y OberKulmer ROTKORN). Como referencia se utilizó una harina integral orgánica de Trigo Pan (*Triticum aestivum* L.) de muy buena calidad. Todas las muestras provenían de explotaciones orgánicas certificadas y su producción fue realizada en la campaña 2018, en la Subregión triguera IV Argentina, (Trigo Argentino, 2020). Se analizaron muestras representativas de un mismo lote.

A continuación se informan los ensayos de calidad aplicados y técnicas utilizadas para el presente estudio:

Granulometría: equipo vibrador Zonytest (Sistema tridireccional tipo Ro-Tap), provisto de tamices según Normas A.S.T.M. E-11/70 IRAM 1501. **Humedad:** IRAM 15850-I: 2009, **Cenizas:** IRAM 15.851:2009. Para estimar la actividad alfaamilásica se utilizó el **Falling Number** Mod.1400 (Perten, Hagersten, Suecia), IRAM 15.8:206203. Se determinó **Color** en harina, miga y corteza de pan por Método triestímulo, Minolta Chroma Meter CR-310 notación Hunter *Lab* que define cada color a partir de tres coordenadas denominadas L*, a* y b*.

Estos valores se integraron en el **Indice de Pardeamiento ó Browning Index** (BI) como medida de la pureza del color marrón; El Gluten Húmedo, Gluten Index y Seco se realizó en Glutomatic (Pertten, Hagersten, Suecia) según: Norma IRAM15.864-2*: 2013.

El **Alveograma** se realizó con el Alveograph modelo 2018, Chopin, Francia (Norma IRAM 15857: 2012), obteniendo la Fuerza panadera (W , Joules x10⁻⁴) y Relación tenacidad/extensibilidad (P/L).

El **Farinograma** se trazó según IRAM 15.855:2000 con un farinógrafo Brabender-E (Brabender OHG, Duisburg, Alemania). Se obtuvieron el porcentaje de absorción de agua (AA), Tiempo de desarrollo de la masa en minutos (TD), Estabilidad en minutos (EST), Aflojamiento en unidades farinográficas (AFLO) y Número de Calidad Farinográfico (FQN).

Perfil de Viscosidad: (Norma ICC, Standard No. 162 ,1996), utilizando un viscoanalizador, Rapid Visco Analyzer (RVA- súper 4; Newport ScientificPty. Ltd., Australia) siguiendo el perfil del método estándar 1. Los parámetros obtenidos fueron: Viscosidad máxima (VISC MAX), Viscosidad media (VISC MED), Viscosidad final (VISC FINAL), Set Back o Retrogradación (SETBACK) diferencia entre VISC FINAL y VISC MED, Break down o Estabilidad (BDOWN) diferencia entre VISC MAX y VISC MED, Temperatura de pasting (TPASTING).

Perfil de Capacidad de Retención de Solventes (SRC) (Método 56-11, AACC, 2000) utilizando solución de: agua destilada, ácido láctico 5% (p/p), sacarosa 50% (p/p) y carbonato de sodio 5% (p/p).

El test **MIXOLAB**®, Chopin Technologies, Francia, (AACC Method 54-60.01) proporcionó información sobre la harina durante 5 fases en las que varía su consistencia debido a los cambios de temperatura que experimenta la masa.

Ensayo Panificación: (Norma IRAM 15858:2019) Parte 2 - Método experimental para ser usado en programas de mejoramiento de trigo. Se determinó: AA % absorción de agua, T. AMAS: Tiempo de amasado (minutos); T.FER: Tiempo de fermentación (minutos); Ve: Volumen del pan/peso del pan; VP: Valor Panadero: calificación relativa del pan tomando como referencia 700 cm³ de volumen, 60% de AA y 140 min de tiempo de fermentación.

Ensayo de Calidad Galletera: Método del Instituto Americano de Panificación (ABI) – Kansas, Manhattan. USA (AACC 10-50D). Los parámetros obtenidos fueron diámetro (DG, cm), factor galleta (FG) (relación largo de 4 galletas, cm, y alto de 4 galletas, cm) y características sensoriales de aspecto exterior e interior de las mismas.

Se evaluó la presencia de **Macro y Micronutrientes: Nitrógeno Total:** (factor 5,7) por método de Kjeldahl. **Grasa Bruta:** extracción continua con hexano con extractor Soxhlet. **Fibra Bruta:** se partió de una muestra desengrasada que luego fue digerida con soluciones de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio y calcinado el residuo. La diferencia de pesos después de la calcinación indica la cantidad de fibra presente; **Sodio (Na) y Potasio (K):** Determinación mediante fotometría de llama. **Fósforo (P), Hierro (Fe) y Calcio (Ca):** mediante espectrofotometría de absorción molecular en el visible utilizando una reacción previa. **Magnesio (Mg):** Determinación mediante volumetrías por formación de complejo.

El pH, la acidez etanólica y la acuosa se determinaron en extractos de harina y utilizando peachímetro y volumetrías ácido base.

2.1. Análisis estadístico

Los resultados de las determinaciones realizadas durante el estudio se procesaron estadísticamente a través del paquete estadístico InfoStat versión 2016, (Di Rienzo, Casanoves, Balzarini, & González, 2016), mediante un ANOVA y prueba de Fisher ($p > 0,05$). De cada ensayo o análisis se realizaron tres repeticiones en cada muestra.

3. Resultados y Discusión

Para caracterizar las harinas integrales de Trigo Espelta se evaluaron: la granulometría, el color, aspectos nutricionales, las calidades plásticas y de viscosidad y la calidad panadera y galletera. Se tomó como referencia a una harina integral de Trigo Pan de conocida buena calidad, ver Figura 1.



Figura 1: Harinas integrales utilizadas para este estudio

3.1. Granulometría

El tamaño de las partículas influye en los parámetros de absorción y retención de agua, así como en las propiedades reológicas de la masa según mencionaron Al-Sager, et al (2000). Considerando que en este trabajo se utilizaron harinas de distinto origen disponibles en los comercios y que para su obtención, los granos recibieron diferente tipo de procesamiento (acondicionamiento y molienda) se determinó la granulometría.

Tabla N° 2: Distribución en porcentaje (%) de fracciones de harinas integrales retenidas sobre tamices de 500, 297,177 micrones y fondo del tamiz.

HARINA INTEGRAL	500 micrones	297 micrones	177 micrones	Fondo tamiz
	%	%	%	%
Dinkel ECOFAUNO	59 a	1 a	3 a	37 c
OberKulmerROTKORN	34 c	4 a	4 a	57 a
Trigo Pan	44 b	4 a	4 a	48 b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la Tabla N° 2 se presentan los resultados de la distribución en porcentaje (%) de las fracciones de harinas integrales retenidas sobre tamices de 500, 297,177 micrones y fondo del tamiz. Las tres muestras presentaron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de material retenido sobre el tamiz de 500 micrones y el fondo.

La harina Dinkel ECOFAUNO presentó mayor retención sobre el tamiz de 500 micrones (59%) y menor porcentaje (37%) de harinas de menor granulometría. En la situación inversa encontramos el comportamiento de OberKulmer ROTKORN con la menor retención de partículas gruesas (34%) y el mayor porcentaje de harinas finas (57%). La harina de Trigo Pan tuvo un comportamiento intermedio en la distribución respecto de las dos harinas de espelta. Se debe considerar que las harinas integrales OberKulmer ROTKORN y Trigo Pan fueron obtenidas con el mismo molino.

3.2. Evaluación de la composición centesimal y parámetros cromáticos

En la Tabla N° 3 se presentan los valores promedio del porcentaje de Ceniza (CEN), Humedad (HUM), Falling Number (FN) y los parámetros cromáticos para el color (L^* , a^* y b^*) y el BI, índice de pardeamiento.

El valor de la ceniza expresa el contenido total de sustancias minerales. Ambas variedades de Trigo Espelta mostraron diferencias estadísticamente significativas frente al Trigo Pan, obteniéndose para la variedad OberKulmer ROTKORN el nivel más alto en contenido de cenizas. El más bajo se observó en la harina integral de Trigo Pan.

Los minerales del grano se encuentran concentrados en las capas más externas del mismo y una mayor proporción de salvado en harina, dará mayores valores de cenizas, aportando a su vez, un color más oscuro, más sabor y capacidad de fermentación, Antoja Giralt, (2015). La variedad Dinkel ECOFAUNO presentó el mayor contenido de cenizas respecto de las otras harinas, coincidiendo con Spisni et al., 2019, quienes mencionaron que pueden encontrarse diferencias entre los trigos, especialmente en términos de contenido mineral, con una ventaja en los trigos más antiguos.

El contenido de humedad fue normal y estuvo por debajo del 14% exigido en la comercialización de harinas en nuestro país, destacándose el Trigo Pan por su valor más bajo. Cuanto menor sea su contenido de agua, mayor será la absorción de agua de la harina durante el amasado para obtener una buena consistencia de la masa panaria, Antoja Giralt, (2015).

Para el caso de la actividad amilásica (FN en segundos) se observaron valores similares y menores en las harinas integrales de Espelta respecto de los obtenidos para Trigo Pan. Los autores Wiwart et al., en 2017, compararon un set de quince variedades de trigo espelta frente a dos variedades de trigo blando hallando que estos últimos poseían menor actividad amilásica.

Para la evaluación de los parámetros de color las muestras de harina integrales presentaron como coordenada de L^* un rango de valores entre 82,42 a 76,42, siendo la variedad OberKulmer ROTKORN la que tuvo un valor de luminosidad mayor respecto a las otras. Los tonos amarillo claro hacen referencia a valores positivos de b^* y en particular, la variedad Dinkel ECOFAUNO presentó un menor tono amarillo. Los valores de a^* fueron positivos (1,67 a 0,68) encontrándose dentro de la zona de los tonos rojizos y presentando diferencias estadísticamente significativa entre sí. El BI es un índice que integra las mediciones de color. La harina de Trigo Pan mostró el mayor valor y diferente respecto de las harinas de Espelta.

Tabla N° 3: Valores promedio del porcentaje de Ceniza, Humedad, Falling Number y parámetros cromáticos sobre harinas integrales

HARINA INTEGRAL	CEN %	HUM %	FN s	Parámetros cromáticos			
				L*	a*	b*	BI
DINKEL ECOFAUNO	2,241 b	13,18 b	321 b	77,48 b	1,16 b	9,1 b	13,21 b
OberKulmer ROTKORN	2,345 a	13,34 a	332 b	82,42 a	0,68 c	10,3 a	13,54 b
Trigo Pan	1,960 c	13,00 c	383 a	76,42 c	1,67 a	10,2 a	15,43 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Las variaciones en el contenido de proteína y gluten en el grano pueden influenciar significativamente las propiedades de fuerza de las masas de las variedades de trigo. Sin embargo, la cantidad no explica las diferencias en calidad que existe entre los cultivares de trigo, Gomez Becerra et al.(2010).

En una revisión realizada por Escarnot y col. (2012), sobre el contenido y los perfiles de macronutrientes en espelta y trigo pan, demostró que diferencias en la composición química de los diversos cultivares de trigo, se encuentran fuertemente influenciadas por su genética, pero también por el ambiente y por la interacción entre ambos. Asimismo, se destaca que los granos vestidos poseen mayor contenido de proteínas y cenizas que los trigos desnudos por su menor tamaño, y una mayor relación Superficie/Volumen, indicando que a mayor cubierta del grano mayor será el contenido de proteínas y de minerales/cenizas

Se observaron diferencias significativas en % NT, % PB y % GB entre las tres harinas analizadas presentadas en la Tabla N° 4.

Tabla N°4: Valores promedio de % Nitrógeno, Proteína, Grasa y Fibra Bruta

HARINA INTEGRAL	% NT	%PB	%GB	%FB
Dinkel ECOFAUNO	2,1983 a	12,53 a	2,4463 b	1,3788 a
OberKulmer ROTKORN	1,7136 c	9,77 c	1,9780 a	1,4624 a
Trigo Pan	1,9910 b	11,35 b	2,1414 c	1,4406 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

La Tabla N° 5 presenta los valores de los parámetros de acidez, pH y minerales cuantificados (mg/100g). La variedad Dinkel ECOFAUNO presentó un valor 2,4463% de Grasa Bruta y 1,5057% de Fibra Bruta, siendo estadísticamente diferente respecto de la otra variedad. Los minerales analizados presentaron concentraciones similares, destacándose un contenido mayor en Fósforo y Sodio también en Dinkel ECOFAUNO. Para una mejor asimilación de los minerales es aconsejable realizar una fermentación moderada en la harina de los productos a panificar. Antoja Giralt, (2015).

Tabla N° 5: Valores promedios de acidez, pH y minerales analizados

HARINA INTEGRAL	Acidez en alcohol mgH ₂ SO ₄ /100g	pH	Na mg/100g	K mg/100g	P mg/100g	Fe mg/100g	Ca mg/100g	Mg mg/100g
Dinkel ECOFAUNO	148,47 b	6,23 ab	6,55 a	316,85 a	174,37 a	5,9 ab	43,83 a	187,3 a
OberKulmer ROTKORN	129,07 b	6,17 b	2,17 b	325,15 a	161,87 b	6,2 a	39,67 a	169,9 a
Trigo Pan	198,73 a	6,33 a	2,05 b	317,55 a	159,57 b	4,5 b	38,40 a	191,6 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

La acidez en cereales y derivados, se debe a la presencia de fosfatos ácidos (KH_2PO_4) y de pequeñas cantidades de ácidos orgánicos. Este valor otorga una idea sobre el estado de conservación de las harinas, ya que durante el almacenamiento pueden ocurrir cambios por actividad de las enzimas lipasas. El grado de acidez de una harina también depende del grado de extracción y de la variedad del trigo, de las condiciones agrícolas climáticas donde se ha desarrollado el trigo. Si bien no se presentaron diferencias significativas entre las dos espeltas si se obtuvo frente a Trigo Pan y es importante destacar que para las dos variedades de espeltas, los valores de acidez se vinculan con los valores de cenizas y de Fósforo mayores que en Trigo Pan.

3.3. Determinación de propiedades reológicas

Para caracterizar las interacciones que ocurren durante el amasado se realizaron pruebas agregando agua destilada o solución salina (según la metodología utilizada) a las harinas integrales.

El gluten es responsable de las propiedades viscoelásticas de las masas y la cantidad (GLUTEN HUM y SECO) es el principal factor que determina el uso final de la harina en panificación, (Peña et al., 2002) mientras que el gluten Index (GI) permite obtener una confiable predicción de la calidad del mismo. Las proteínas que forman el gluten son las gliadinas y gluteninas. El balance entre ellas, junto al contenido total de proteínas, es determinante para que la masa tenga las propiedades ideales de panificación. La fuerza panadera se evaluó por medio del alveograma (W y P/L) y el comportamiento durante el amasado con el farinograma (AA, TD, EST, AFLO y FQN).

Estos ensayos son utilizados por la industria para separar o clasificar las partidas o lotes de harina con el objetivo de responder a requisitos concretos para la elaboración de productos leudados. En la Tabla N° 6 se indican los valores obtenidos y su análisis estadístico. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las tres harinas para el parámetro de la calidad del gluten (GI), fuerza panadera (W) y la relación de tenacidad y extensibilidad (P/L) y en los aspectos farinográficos TD, EST y FQN. Todos los parámetros referidos se encuentran mayormente asociados a diferencias genéticas.

Tabla N° 6: Valores promedio de los parámetros vinculados a la calidad y cantidad de gluten, alveograma y farinograma.

HARINA INTEGRAL	% Gluten			Alveograma		Farinograma				
	HUM	GI	SECO	W (Jx10 ⁴)	P/L	AA (%)	T.D. (min)	EST. (min)	AFLO (min)	FQN
Dinkel ECOFAUNO	24,8a	95 b	9,0 a	107 b	3,26 b	55,0 b	5,70 b	7,8 a	62 c	106 a
OberKulmer ROTKORN	21,1 b	93 c	7,5 b	86 c	2,22 c	55,5 b	2,77 c	3,5 c	91 b	45,7 c
Trigo Pan	20,6 b	98 a	7,2 b	183 a	4,30 a	67,8 ^a	7,13 a	5,3 b	114 a	95,6 b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la harina integral de Dinkel ECOFAUNO el contenido de Gluten HÚMEDO y SECO fueron los más altos y presentaron diferencias significativas respecto de las otras harinas. Para el GI, la mayor parte de la bibliografía indica que el gluten de espelta tiene menor fuerza que el de trigo pan, sin embargo esta

apreciación se basa en análisis realizados sobre harinas blancas (Wiwart et al., 2017, Podolska et al., 2020). De acuerdo con el trabajo de Cubadda et al. (1992), un GI >80% corresponde a un gluten fuerte. En nuestro estudio y a pesar de tener diferencia estadística, los valores de GI en valor absoluto fueron altos en las tres harinas.

La fuerza panadera medida a través del W mostró diferencia estadística significativa para las tres harinas, siendo la mayor en Trigo Pan, seguida por Dinkel ECOFAUNO y OberKulmer ROTKORN (183, 107 y 66 respectivamente). Las masas resultaron ser tenaces (baja relación entre gliadinas/ gluteninas) y con diferencia estadística significativa entre ellas.

La de mayor tenacidad fue la harina integral de Trigo Pan, excesivamente fuerte con P/L de 4,30.

En la Figura 2, se presenta el comportamiento alveográfico de las tres harinas integrales

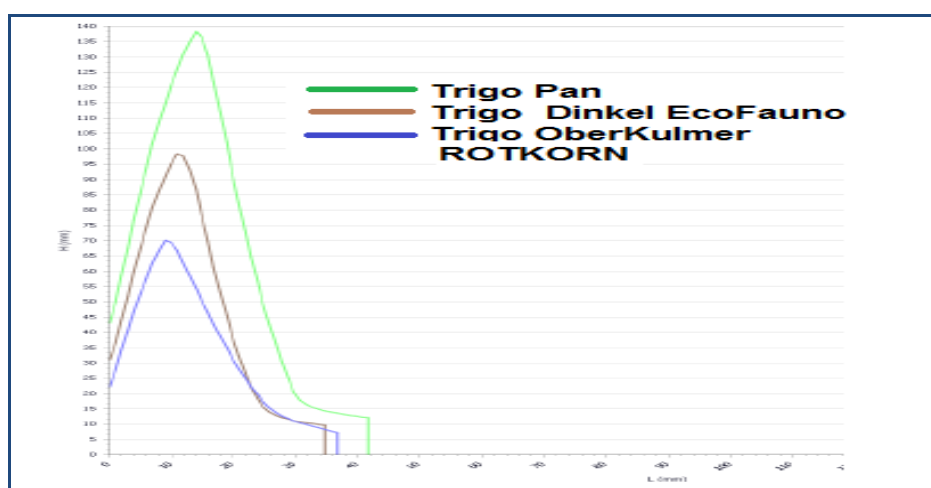


Figura 2: Comparación alveográfica de las tres harinas integrales evaluadas.

La calidad del producto final de la harina se relaciona con la absorción de agua del farinograma y con el contenido de proteína. El tiempo de desarrollo es el requerido para que se hidraten las proteínas y la estabilidad indica la fuerza de la masa. (Magaña-Barajas y col., 2009). En este análisis se observaron diferencias estadísticamente significativas al nivel en los parámetros de absorción de agua (AA) y Tiempo de desarrollo (TD) en la harina integral de Trigo Pan respecto de las harinas de Espelta. En las Figura 3 a) y b) se presenta el desempeño farinográfico del Trigo pan vs. Dinkel ECOFAUNO y Trigo pan vs. OberKulmer ROTKORN.

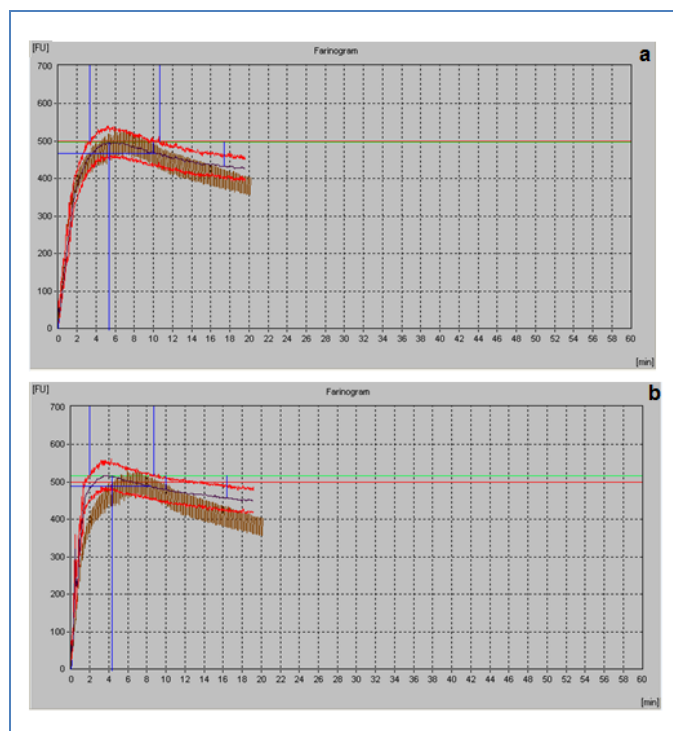


Figura 3: a) Farinogramas de Trigo Pan vs. Dinkel EcoFauno b) Farinogramas de Trigo Pan vs. Trigo OberKulmer ROTKORN

3.4. Determinación de propiedades térmicas

Las cualidades funcionales de las harinas y los almidones por efecto del calor experimentan cambios físicos y químicos que influyen en la calidad del producto final. Las propiedades viscosas dependen de varios factores como el tipo de cereal (características genéticas y dureza de grano) condiciones ambientales, contenido relación amilosa-amilopectina (Sasaki et al., 2007), efecto de molienda sobre el grano de trigo y parámetros relacionados a este como son almidón dañado, granulometría y carga enzimática (Kurimoto, 1988). Una manera de evaluar esos cambios térmicos es utilizando un analizador rápido de viscosidad donde se determina la temperatura de hinchamiento de los gránulos de almidón por el incremento de la viscosidad. En la Figura 4 se muestra gráficamente el perfil de viscosidad de las harinas analizadas.

En la Tabla N° 7 se muestra que el parámetro TPASTING presentó diferencias estadísticamente significativas para las tres harinas analizadas, siendo menor para la harina de Trigo Pan.

La VISCMAX se refiere al pico máximo de viscosidad alcanzado por la harina cuando se calienta en presencia de agua. Los valores de VISCMAX y VISCMED de la harina Dinkel ECOFAUNO fueron significativamente menores respecto de las otras harinas.

El responsable del incremento de viscosidad de una mezcla de agua y harina durante el calentamiento es el almidón, por lo que un menor contenido porcentual de proteínas indicaría una mayor proporción de almidón que podría explicar la mayor viscosidad de las harinas de Trigo Pan y OberKulmer ROTKORN.

En este estudio, los bajos valores (BDOWN) para la harina DINKEL ECOFAUNO revelan una mejor estabilidad de pasta. Este resultado indicaría la resistencia de los gránulos de almidón a la ruptura y fuerza de cizalla y como consecuencia su tendencia a romperse (Singh et al., 2010; Moiraghi, 2013). En trigos de mayor dureza, el agua ingresa a los gránulos con menor dificultad, y se espera que tengan temperaturas de gelatinización más bajas Caballero Barrigón y Rodríguez, (2009). Si bien en este estudio no conocemos el nivel de dureza de los granos, los autores Wilson et al., en 2008, evaluaron cinco Trigos Espelta durante tres años con un Trigo Pan como control encontrando menor dureza y almidón dañado en los Trigos Espelta. En 2007, Sasaki et al., detallaron la influencia que posee el tamaño de partículas en el perfil de pastificación del almidón.

Tabla N° 7: Valores promedio de parámetros de viscosidad de almidones sobre harinas integrales.

HARINA INTEGRAL	TPASTING (°C)	VISCMAX	VISCMED	VISCFINAL	SETBACK	BDOWN
Dinkel ECOFAUNO	88,08 b	162,25 b	104,58 b	313,89 b	209,31 ab	57,67 c
OberKulmer ROTKORN	89,77 a	248,20 a	135,11 a	325,42 b	190,30 b	113,08 a
Trigo Pan	87,05 c	238,14 a	141,36 a	373,97 a	232,61 a	96,78 b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

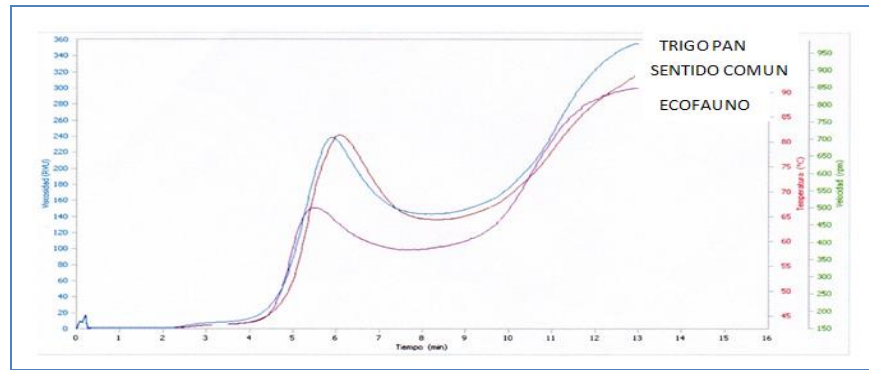


Figura 4: Perfil de viscosidad de harinas integrales analizadas

3.5. Análisis complementarios: Capacidad de Retención de Solventes y Test MIXOLAB®

Con el objetivo de lograr una mayor comprensión de las características de las harinas integrales estudiadas se realizaron otras determinaciones: SRC (Solvent Retention Capacity o capacidad de retención de solventes) y el Test MIXOLAB®.

3.5.a. Capacidad de retención de solventes

Por este método se analizó el efecto de la presencia de las gluteninas, almidón dañado y pentosanos en las harinas y su contribución individual sobre el comportamiento final de la masa. Este ensayo es una medida de hidratación

basada en la capacidad de absorción de los diferentes polímeros presentes en la harina al ponerlos en contacto con: agua destilada, ácido láctico 5% m/m (para la medición de gluteninas), carbonato de sodio 5% m/m (para la medición de almidón dañado), y sacarosa 50% m/m (para la medición de pentosanos). En la siguiente Tabla N° 8 se describen las diferencias estadísticas encontradas para las tres harinas evaluadas.

Tabla N° 8: Valores promedio del perfil de capacidad de retención de solventes (RSC) sobre harinas integrales

HARINA INTEGRAL	Parámetros			
	SRCA (%)	SRCL (%)	SRCS (%)	SRCC (%)
Dinkel ECOFAUNO	51,66 c	56,14 b	68,20 b	60,49 c
OberKulmer ROTKORN	55,94 b	58,15 b	81,14 a	67,42 b
Trigo Pan	75,07 a	75,04 a	84,20 a	90,27 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

El valor de SRCA se relaciona con todos los componentes hidrofílicos de las harinas. Las diferencias en la composición química de las harinas determina su absorción de agua y su capacidad de uso final, valores elevados son deseados para la elaboración de panes mientras que para galletitas se los prefiere bajos, ya que se trata productos secos, Levine & Slade, (2004). En este estudio las tres harinas tuvieron diferente absorción de agua siendo mayor en Trigo Pan. El parámetro SRCL se encuentra relacionado con el contenido de gluteninas. El Trigo Pan, con un valor de 75,04 superó a las dos variedades de Espelta, que no presentaron diferencias estadísticas entre sí. Este resultado puede asociarse con la mayor fuerza panadera medida por valor de W en el Trigo Pan. El valor de SRCS se relaciona con el contenido de pentosanos que son hemicelulosas solubles e insolubles que forman las paredes celulares. Los trigos Oberkulmer ROTKORN y Trigo Pan presentaron los mayores valores de SRCS sin diferencias estadísticas entre ellas, superando a Dinkel ECOFAUNO. Finalmente, el valor de SRCC se relaciona con el almidón dañado, observándose el mayor en la harina de Trigo Pan, seguido por Oberkulmer ROTKORN y finalmente Dinkel ECOFAUNO. Los autores Ram et al. (2005), describieron que uno de los factores que más influye en la absorción del agua es la presencia del almidón dañado que también se asocia a una mayor dureza de los granos.

3.5.b. Test de MIXOLAB®

Considerando la importancia que tiene la inclusión de harinas con salvado en la dieta y el consumo de productos ricos en fibra, se utilizó una metodología complementaria para la caracterización de estas harinas. El test es específico para ese tipo de material ya que las pruebas tradicionales no consideran a las harinas ricas en fibra. Esta misma dificultad es mencionada por Sehn y Steelen 2017, quienes observaron la falta de correlación de los parámetros reológicos actualmente utilizados por las industrias de molienda y panadería en la harina integral y para las características tecnológicas del producto final.

Se realizaron ensayos en el equipo MIXOLAB®, cuya función es evaluar las propiedades reológicas de las harinas integrales durante el mezclado:

absorción de agua, tiempo de desarrollo y estabilidad de la masa, a la vez que determina la calidad de la proteína y el almidón y la actividad amilolítica. La medida se registra en tiempo real (min) a través del torque (Nm) observándose la consistencia de la masa mientras experimenta cambios de temperatura. Durante las cinco fases o etapas se obtienen una serie de valores C1, C2, C3, C4, C5 y las pendientes α , β y γ de la curva a través de todo el ensayo con duración igual a 45 minutos, ver Tabla N° 9.

Los valores obtenidos durante la etapa 1 y evaluada a temperatura constante de 30 °C, indican el comportamiento y el desarrollo de la masa para alcanzar el valor máximo de torque (1,1 Nm). Esta etapa determina además la estabilidad de la masa relacionada con el contenido de proteínas y la absorción de agua. Si bien el valor C1 no presentó diferencias estadísticamente significativas para las harinas estudiadas, si se observaron diferencias significativas en el tiempo para alcanzar este valor máximo en los Trigos Espeltas respecto del Trigo Pan. Cuanto menor es el resultado de la pendiente α , mayor es el debilitamiento de las proteínas, Oberkulmer ROTKORN presentó diferencias significativas respecto del Trigo Pan y Dinkel ECOFAUNO.

En la fase dos, se incrementa la temperatura de la cubeta de amasado a razón de 4°C/min, y también de la masa, observándose una reducción del torque que correspondiente al debilitamiento de la proteína. Cuanto mayor es el valor del resultado obtenido, mayor es la resistencia a la desnaturalización de las proteínas, dado que corresponde a la disminución de la consistencia de la masa a medida durante el incremento térmico.

La variedad de Trigo Oberkumer ROTKORN presentó una mejor performance frente al efecto térmico y de sobreamasado combinado, respecto a las demás variedades evaluadas.

En la fase tres, se observa el comportamiento del almidón durante el calentamiento hasta los 90 °C. Cuanto mayor sea el valor de C3, más viscosa resultará la masa. Las tres harinas integrales estudiadas presentaron valores de viscosidad diferenciados estadísticamente entre sí. En esta etapa se define la pendiente β , representando a la tasa de gelatinización del almidón. A mayor valor de la pendiente β , indica una mayor la velocidad de gelatinización, que en este caso es para Oberkulmer Rotkorn.

Tabla N° 9: Valores promedios de parámetros obtenidos mediante la caracterización de harinas integrales utilizando el equipo MIXOLAB®

Parámetros	Trigo Dinkel ECOFAUNO	Trigo OberKulmer ROTKORN	Trigo Pan
C1 (Nm)	1,088 a	1,110 a	1,122 a
Tiempo C1 (min)	10,677 a	4,460 b	10,100 a
C2 (Nm)	0,270 b	0,384 a	0,282 b
C3 (Nm)	2,106 a	1,911 b	1,992 c
C4 (Nm)	2,125 a	1,586 b	1,603 b
C5 (Nm)	3,281 a	3,275 a	2,030 b
(C5-C4/C5)*100	35 %	51%	21%
Estabilidad	10.86 b	10.32 b	14.75 a
Hidratación	54.93 b	52.97 c	61.80 a
Pendiente de α (Nm/min)	-0,0713 a	-0,3513 b	-0,072 a
Pendiente de β (Nm/min)	0,000 c	0,671 a	0,599 b
Pendiente de γ (Nm/min)	0,0000 a	-0,0487 b	-0,0507 b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

El comportamiento de la actividad amilásica fue evaluado en la fase cuatro. La ruptura de los gránulos e hidrólisis del almidón es provocado por el efecto de la fricción mecánica y la temperatura (con mantenimiento térmico a 90°C), donde se produce un descenso en la consistencia de la masa. La variedad Dinkel ECOFAUNO presentó un menor valor de C4, comportamiento asociado a una mayor actividad amilolítica. En particular, la diferencia de valores entre C2-C3, el valor de C3 y C4, pueden ser vinculados directamente a los valores de FN. Cuanto mayor es esta diferencia y los valores de estos parámetros C3 y C4, menor es el valor de FN, lo que implica una alta actividad de las enzimas amilasas. La última fase cinco revela el comportamiento de la masa cuando es sometida a un descenso térmico desde 90 °C hasta 50 °C. El aumento de consistencia está asociado a la retrogradación del almidón, consecuencia de la bajada de temperatura y su consecuente cristalización, mediante el parámetro C5. Las harinas de trigo Espelta presentaron mayores valores del parámetro C5, sin diferencias entre ellas pero si respecto del Trigo Pan. Al calcular el valor porcentual de retrodegradación de las harinas $(C5-C4)/C5 \times 100$, el mayor valor lo obtuvo el Trigo Oberkulmer ROTKORN. La pendiente y en esta etapa indica la velocidad de degradación de la alfa amilasa. En este caso no hubo diferencia estadística entre Oberkumer y Trigo Pan. En la Figura 5 se muestran la diferentes gráficas brindadas de las harinas evaluadas a través del equipo MIXOLAB®.

De este ensayo se puede inferir la potencialidad de uso de las diferentes variedades de los trigos. Se destaca la similitud en estabilidad y absorción de los trigos espeltas, siendo más adecuados para la elaboración de galletitas frente al Trigo Pan que presentó mayor estabilidad, absorción y menor índice de retrodegradación del almidón, con una mejor performance para la obtención de productos panificados. La determinación mediante el equipo de MIXOLAB® resultó complementaria a los análisis obtenidos mediante los estudios de alveograma y farinograma, facilitando la tarea de caracterización de las harinas, calidad y utilización.

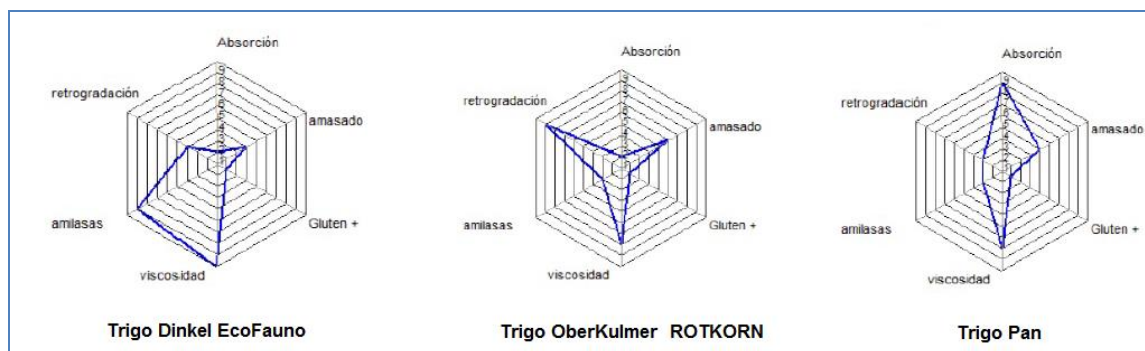


Figura 5: Perfiles de harinas integrales obtenidos a partir del análisis mediante el Equipo MIXOLAB®

3.6. Análisis sobre productos elaborados con harinas integrales

Para conocer la capacidad l y la aptitud de una harina, es necesario realizar un ensayo definitorio como es la elaboración de productos tales como el pan o las galletitas.

3.6.a. Panificación en moldes

Los parámetros medidos sobre los productos elaborados se muestran en la Tabla N° 10 y en la Figura 6 se observan los panes. En la evaluación general de panificación el volumen (VOL) en las tres harinas no presentó diferencias significativas, logrando el mínimo valor que permite el método de panificación (400 cm^3). Esto puede adjudicarse a la metodología utilizada en este trabajo que fue desarrollada para evaluar harinas blancas en los programas de mejoramiento. En cambio, la AA presentó diferencias significativas siendo mayor en harinas provenientes de Oberkulmer ROTKORN y Trigo Pan respecto de Dinkel ECOFAUNO. El VP que integra la AA, T.FER. y VP fue significativamente menor para Dinkel ECOFAUNO, lo que indicaría un menor desempeño panadero a pesar de no tener diferencia en volumen bajo un método normalizado. Varios componentes del salvado tienen impacto negativo en el tiempo de desarrollo de la masa ya que interaccionan con las proteínas del gluten (Khalid et al., 2017).

Tabla N° 10: Valores promedio obtenidos en el ensayo de panificación

HARINA INTEGRAL	PANIFICACION					
	AA (%)	T. AMAS (min)	T.FER. (min)	VOL (cm^3)	Ve (cm^3/g)	VP
Dinkel ECOFAUNO	55,5 b	2 00" b	110 a	400 a	2,6 b	77 b
Oberkulmer ROTKORN	58,0 a	2 30" a	127 a	400 a	2,7 a	81 a
Trigo Pan	58,0 a	2 30" a	122 ab	400 a	2,7 a	80 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

El color es uno de los atributos más importantes tanto para la harina como en los productos panificados y es una propiedad sensorial asociada al sentido de la vista. Para evaluar el color de la corteza sobre los panes y de la miga, se utilizó un medidor triestímulo midiéndose L^* , a^* , b^* y posteriormente se integró los valores en el BI para su mejor interpretación. En la Tabla N°11 se presentan los valores obtenidos. De acuerdo a los resultados la corteza del pan realizado con la harina de Trigo Pan es menos luminosa y más oscura en comparación con los otros panes de Espelta. En el caso de la miga la más oscura correspondió a Oberkulmer ROTKORN.

Tabla N° 11: Determinación de parámetros de color y BI en la corteza y miga de los panes elaborados

HARINA INTEGRAL	CORTEZA				MIGA			
	<i>L</i> [*]	<i>a</i> [*]	<i>b</i> [*]	<i>BI</i>	<i>L</i> [*]	<i>a</i> [*]	<i>b</i> [*]	<i>BI</i>
DINKEL ECOFAUNO	49,85 b	13,19 ab	25,18 b	87,06 ab	55,13 a	9,25 a	19,97 b	56,01 b
OberKulmer ROTKORN	59,32 a	13,02 b	28,36 a	79,05 b	54,83 a	9,97 a	22,93 a	65,66 a
Trigo Pan	44,13 b	14.43 a	22,78 c	93,11 a	58,21 a	9.65 a	21.5 ab	56.83 b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tanto la granulometría, o el grado de almidón dañado, o el contenido de amilasas, contribuyen también a la coloración del producto. En particular, cuando el contenido en α -amilasas es excesivo, pueden obtenerse colores de corteza rojizos (a^*). Sumado a lo anterior, la espelta contiene almidón que se puede hidrolizar más fácilmente en azúcares, participando en las reacciones de Maillard o caramelización que imparten el característico color dorado-

amarillento en el pan corteza. La harina y su tasa de extracción, es decir, la cantidad de harina que se obtiene de la molienda de una cierta cantidad de trigo, es factor determinante de su color. OberKulmer ROTKORN fue estadísticamente diferente en el BI en corteza y miga.

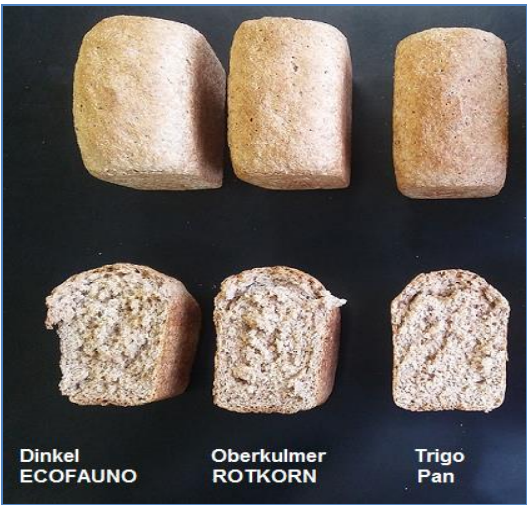


Figura 6: Panes obtenidos a partir de harinas integrales.

3.6.b. Elaboración de galletitas dulces

La aptitud de una harina para elaborar galletitas dulces se puede resumir en dos grandes términos. Por un lado el tamaño de la galleta, dado por el diámetro (DG, cm) y el Factor galleta (FG) que relaciona el diámetro con el espesor (cm) de cuatro galletas, siendo deseables galletitas de buen diámetro y bajo espesor. A eso se debe sumar su textura y consistencia al quiebre, en este punto lo deseado es que estas sean tiernas y crocantes, con una textura abierta, (Barrera y col., 2012; Lezcano, 2015; Hoseney, 1991).

Tabla N° 12: Valores promedio obtenidos en el ensayo de galletitas

HARINA INTEGRAL	DIAMETRO (cm)	ALTO 4 GALLETAS (cm)	LARGO 4 GALLETA (cm)	FG
Dinkel ECOFAUNO	7,53 a	2,00 c	30,27 a	15,20 a
OberKulmer ROTKORN	6,93 b	2,80 b	27,73 b	9,53 b
Trigo Pan	6,37 c	3,07 a	25,20 c	8,23 c

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Las galletitas provenientes de las tres harinas presentaron características de calidad estadísticamente diferentes (Tabla N° 12). El mayor diámetro y factor galleta lo presentó la harina Dinkel ECOFAUNO seguida de Oberkulmer ROTKORN y finalmente la de harina integral de Trigo Pan. A pesar de tener el mayor FG la harina Dinkel ECOFAUNO, no fue la que obtuvo la mejor calidad galletitera.

La apreciación sensorial mostró que las galletitas resultaron muy finas, duras a la mordida, con buena aireación, percibiendo partes del grano debido a la granulometría de la misma. También con buen diámetro pero con contornos irregulares y el color fue oscuro (Figura 7). Las galletitas realizadas con harina

espelta Oberkulmer ROTKORN mostraron buen craquelado en la superficie, bordes regulares, tiernas, crocantes con buena aireación y de buen sabor dando la mejor performance en cuanto a calidad galletera. Las galletitas de Trigo Pan presentaron aspecto exterior deseable, con un buen diámetro, color deseado pero a la mordida no fueron crocantes.



Figura 7: Galletitas obtenidas a partir de harinas integrales. Vista externa e interna

4. Conclusiones

A partir de este estudio, se logró caracterizar las harinas integrales de dos variedades de espelta y evaluar su aptitud para la elaboración de diferentes productos panificados como pan y galletitas.

Se corroboró que el trigo Espelta posee gluten lo que permite realizar productos leudados.

El análisis de relaciones existentes entre los parámetros de calidad de las harinas estudiadas amplió la información de las variedades de espelta cultivadas en nuestro país.

El perfil analizado para cada variedad permitirá dar mayor difusión tanto para futuros productores como elaboradores de productos a partir de harina de espelta.

Los datos obtenidos en este trabajo pueden ser de utilidad para los nutricionistas al momento de diseñar dietas saludables.

Como trabajos futuros, se prevé explorar variaciones en la formulación y estrategias para la panificación, obtención de galletitas además de realizar el análisis sensorial de los mismos

Agradecimientos

Agradecemos a INTA por el apoyo brindado para realizar esta investigación en el marco del Proyecto Estructural (PE I517) de INTA: "Calidad nutricional y sensorial de alimentos asociada a diversos sistemas de producción agropecuaria" de INTA.

También a las empresas: la Madrecita Orgánica y Molino Sentido Común que nos facilitaron las harinas integrales de Espelta para su análisis.

Bibliografía

1. Al-Saqer, J., Sidhu, J., & Al-Hooti, S. (2000). *Instrumental texture and baking quality of high-fiber toast bread as affected by added wheat mill fractions*. Journal of Food Processing and Preservation 24(1):1 - 16 DOI: [10.1111/j.1745-4549.2000.tb00402.x](https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2000.tb00402.x)
2. Antoja Giralt, F. (2015). *Masas Madre – Sourdough. Elaboración y Utilización*. Madrid: Montagud Editores S.A.
3. Alimentos Argentinos. (2019). Recuperado el Octubre de 2020, de Alimentos
4. Argentinos http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Cadenas%20de%20Valor%20de%20Alimentos%20y%20Bebidas/informes/Resumen_Cadena_2019_HARNA_DE_TRIGO_MARZO_2019.pdf
5. Barrera, G., Bassi, E., Reyes Martínez, R., León, A., & Ribotta, P. (2012). *Efectos de diferentes fracciones de harinas de trigo pan obtenidas con molino industrial sobre la calidad de galletitas dulces*. Agriscientia., 29(2): 69-79.
6. Caballero Barrigón A. y Ruiz Rodríguez L. (2009). *Influencia de la dureza del trigo en las propiedades de las harinas panificables. Métodos analíticos de control del proceso de panificación*. V Congreso Virtual Iberoamericano.
7. Caballero García, L. (2005). *Variabilidad para proteínas de reserva de trigo espelta de origen español*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. España.
8. Cubadda R, Carcea M, Pasqui LA.(1992) *Suitability of the gluten index method for assessing gluten strength in durum wheat and semolina*. Cereal Foods world., 37(12):866-869 AGR: IND93021334
9. Collar, C. (2007). *De tales harinas, tales panes. Granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica*. En A. E. Leon. ISEKI-Food.
10. Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., & González, L. (2016). *InfoStat versión 2016*. Córdoba: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
11. Dinu, M., Pagliai, G., Casini, A., & Sofi, F. (2018). *Mediterranean diet and multiple health outcomes: an umbrella review of meta-analyses of observational studies and randomised trials*. European Journal of Clinical Nutrition, 72(1): 30-43.
12. Dubcovsky, J., & Dvorak, J. (2007). *Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication*. Science, 318:393.
13. Escarnot, E., Jacquemin, J., Agneessens, R., & Paquot, M. (2012). *Comparative study of the content and profiles of macronutrients in spelt and wheat, a review*. BASE, 16(2), 243-256.
14. FAO. (2018). *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*. [fao.org : http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/committees/es/](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/committees/es/)
15. Gómez –Becerra, HF, H Erdem, A Yazici, Y Tutus, B. Torum, L. Ozturk, I. Cakmark. (2010) *Grain concentrations of protein and mineral nutrients in a large collection of spelt wheat grown under different environments*, - Journal of Cereal Science Volume 52, Issue 3, November 2010, Pages 342-349
16. Hosney, R. (1991). En R. Hosney, *Proteínas de los cereales*. En: *Principios de la Ciencia y Tecnología de los Cereales*. (págs. 239-269). American Association of Cereal Chemists, Inc.
17. INASE-Instituto Nacional de Semillas .<https://www.argentina.gob.ar/inase>
18. IRAM- www.iram.org.ar
19. Khalid, K., Ohm, J., & Simsek, S. (2017). *Whole wheat bread: Effect of bran fractions on dough and end-product quality*. Journal of Cereal Science.
20. Konvalina, P., Štěřba, Z., & Vlášek, O. (2005). *Fusarium spp. Occurrence in grains of ancient wheat species*. Corpus ID ;92982566
21. Kurimoto, M. (1988). *The effect of flour particle size on baking quality and the other flour attributes*. Cereal Foods World, 33(5):1:6.

22. Levine, H., & Slade, L. (2004). *Influence of hydrocolloids in low-moisture foods-a food polymer science approach*. Gums and Stabilisers for the food Industry, (12) 425-436.
23. Lezcano, E. (2015). *El trigo y sus derivados. Análisis de la cadena alimentaria*. Alimentos Argentinos: http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/farinaceos/Productos/GalletitasBizcochos_2015. Activa Marzo 2016
24. Magaña-Barajas, E., Ramirez-Wong, L., Platt-Lucero, L., Lopez Ahumada, G., Torres, P., & Sanchez Machado, D. (2009). *Caracterización viscoelástica de masas de variedades de trigos suaves*. Tecnología Ciencia, 24(1):12-22.
25. Marsh, N. M. (2000). *Celiac Disease Methods and Protocols*. Humana Press, ISBN 0-89603-650-2.
26. Moiraghi, M. (2013). *Calidad tecnológica de trigos blandos para la obtención de galletitas. Asociación entre la composición genética del grano y las propiedades físico-químicas de sus harinas*. Tesis Doctoral: Universidad Nacional de Córdoba.
27. Molfese, E., & Di Pane, F. (2019). *Evaluación de la calidad funcional en variedades de Triticum spelta vs Triticum aestivum en cultivos orgánicos de Argentina*. Actas Congreso CyTAL- ALACTA. Buenos Aires.
28. Peña, R., Trethowan, R., Pfeiffer, W., & Van Ginkel, M. (2002). *Quality (end-Use) improvement in wheat: compositional, Genetic and environmental factors*. Journal of Crop Production, 5(1)1-37.
29. Podolska, G., Aleksandrowicz, E., & Szafrńska, A. (2020). *Bread making potential of Triticum aestivum and Triticum spelta species*. Open Life Sciences, 15(1),30–40.
30. Ram, S., Vinamrata, D., Singh, R., & Shoran, J. (2005). *Application of solvent retention capacity tests for the prediction of mixing properties of wheat flour*. Journal of Cereal Science, 42: 261-266.
31. Sasaki, T., Yasui, T., Kiribuchi-Otobe, C., Yanagisawa, T., Fujita, M. & Kohyama, K. (2007). *Rheological properties of starch gels from wheat mutants with reduced amylose content*. Cereal Chemistry, 84(1): 102-107.
32. Sehn, G., & Steel, G. (2017). *Classification of whole wheat flour using a dimensionless number*. J Food Sci Technol., 54(12): 3827–3836.
33. Singh, S., Gupta, A., Gupta, S., & Kaur, N. (2010). *Effect of sowing time on protein quality and starch pasting characteristics in wheat (Triticum aestivum L.) genotypes grown under irrigated and rain-fed conditions*. Food Chemistry, 122(3): 559-56.
34. Shewry, P. (2018). *Do ancient types of wheat have health benefits compared with modern bread wheat?* Journal of Cereal Science, (79),469-476.
35. Spisni, E., Imbesi, V., Giovanardi, E., Petrocelli, G., Alvisi, P., & Valerii, M. (2019). *Differential Physiological Responses Elicited by Ancient and Heritage Wheat Cultivars Compared to Modern Ones*. Nutrients, 11(12), 2879.
36. Trigo Argentino. (2020). *Trigo Argentino*. Recuperado el 2020, de <https://www.trigoargentino.com.ar/Subregiones/SubregionIV>
37. Wilson J. D., Bechtel, D. B., Wilson G.W.T., and Seib P.A (2008). *Bread Quality of Spelt Wheat and Its Starch 1*. Cereal Chem. 85 (5): 629-638
38. Wiwart, M., Szafrńska, A., Wachowska, U., & Suchowilska, E. (2017). *Quality Parameters and Rheological Dough Properties of 15 Spelt (Triticum spelta L.) Varieties Cultivated Today*. Cereal Chemistry, 94(6)-1037-1044.

MICROENCAPSULACIÓN DE ACEITE DE CHIA Y DESARROLLO DE ALIMENTOS ENRIQUECIDOS EN OMEGA-3

Agustín González^{1,2,3}, María G. Bordón^{1,4}, Pablo D. Ribotta^{1,4*} y Marcela L. Martínez^{1,5}

1 Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA - FCEyN - UNC). Córdoba, Argentina.

2 Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Materiales Poliméricos (LaMaP). Córdoba, Argentina.

3 Instituto de Investigaciones y Desarrollo en Ingeniería de Procesos y Química Aplicada (IPQA - CONICET - UNC). Córdoba, Argentina.

4 Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba (ICYTAC - CONICET - UNC). Córdoba, Argentina.

5 Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV - CONICET - UNC). Córdoba, Argentina.

Email: pdribotta@unc.edu.ar

Resumen

Una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados disminuye el riesgo de enfermedades, especialmente las cardiovasculares, el cáncer y los síndromes metabólicos. La incorporación de aceites ricos en omega-3 a los alimentos tradicionales representa una forma eficiente de incrementar su consumo; sin embargo, su baja estabilidad oxidativa puede afectar la calidad y reducir la vida útil de los alimentos. La semilla de chía contiene entre un 25 y un 38% de aceite y es la fuente vegetal más rica en omega-3. La microencapsulación puede constituir una alternativa tecnológica novedosa para proteger este tipo de lípidos. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar las condiciones de microencapsulación del aceite de chía y su incorporación en formulaciones de pan de molde y pastas. Se evaluó el efecto de la incorporación del aceite microencapsulado sobre la calidad de los alimentos y la estabilidad oxidativa del aceite. Los resultados demostraron que el agregado de las microcápsulas de aceite de chía no generó cambios significativos en las propiedades tecnológicas de panes y pastas secas. Por otro lado, la incorporación de aceite de chía sin encapsular provocó un marcado aumento en la generación de productos de oxidación primaria; sin embargo, la utilización de aceite microencapsulado resultó en una buena estabilidad oxidativa durante los procesos productivos. Por lo tanto, se concluye que la vehiculización de lípidos ricos en ácidos grasos omega-3 en matrices particuladas sólidas representa una excelente alternativa tecnológica para su incorporación en alimentos tradicionales.

Introducción y objetivos

Las tendencias alimentarias actuales muestran el fuerte interés de los consumidores por alimentos que, además de tener un alto valor nutricional, aporten beneficios a las funciones fisiológicas del organismo. Existe un marcado incremento en el desarrollo de nuevos productos alimenticios con propiedades funcionales, y los panificados son una de las categorías que ofrecen mayores alternativas (Olagnero et al., 2007). Una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados disminuye el riesgo de contraer muchas enfermedades, especialmente las cardiovasculares, el cáncer y los síndromes metabólicos (Hermida y Gallardo, 2015). Varios estudios han demostrado que los ácidos grasos omega-6 y omega-3 no sólo deben consumirse en cantidades suficientes, sino también en cierta relación entre ellos. Simopoulos (2011) descubrió que una relación de omega-6/omega-3 de 5:1 produce beneficios en las

personas asmáticas, y una relación de 4:1 colabora en la prevención de hasta el 70% de las enfermedades cardiovasculares. Los estudios muestran que las dietas occidentales tienen una relación de entre 10/1 a 20-25/1, lo que indica que son deficientes en ácidos grasos omega-3 (Simopoulos, 2011).

La semilla chía se ha estudiado principalmente por la calidad de su aceite. La misma contiene entre un 25 y un 38% de aceite, de los cuales los principales constituyentes son triglicéridos que contienen altas cantidades de ácidos grasos omega-3 (61-70%) (Martínez et al., 2012). La *International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids* (ISSFAL) y el *Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies* (EUA) recomiendan para un adulto sano, una ingesta diaria de 1 g/día de ácidos grasos omega-3 (ISSFAL, 2004; Trumbo et al., 2002). Dado que la mayoría de la población no logra alcanzar estos requisitos nutricionales básicos debido a preferencias regionales y socioculturales, la suplementación con ácidos grasos poliinsaturados en productos de consumo masivo resulta necesaria (Ganesan et al., 2014).

Si bien una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), representa un impacto positivo en la salud humana; cuando los AGPI se exponen al aire, la luz y las altas temperaturas, se producen reacciones de oxidación que alteran su calidad química y organoléptica, disminuyendo la vida útil de los alimentos que los contienen. La microencapsulación de aceites ricos en ácidos grasos omega-3 y omega-6 en matrices sólidas representa una alternativa tecnológica para proteger los AGPI de la oxidación y vehiculizarlos para poder ser utilizados como ingredientes en alimentos procesados. El cambio del estado físico de aceite líquido a polvo seco constituye una de las principales ventajas del proceso de microencapsulación para varios procesos industriales como el almacenamiento y la formación de mezclas homogéneas entre otros (Barbosa-Cánovas et al., 2005).

Teniendo en cuenta que el consumo de pastas y productos de panadería en Argentina es uno de los más altos del mundo, la incorporación de nutrientes esenciales en este grupo de alimentos representaría un impacto significativo en la calidad de la dieta diaria de las personas. Es importante destacar otras ventajas asociadas a este tipo de producto, como el bajo costo, la facilidad de envasado y el transporte y la distribución.

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente trabajo fue analizar las condiciones de microencapsulación del aceite de semilla de chía y su incorporación en alimentos procesados. Se analizó la vehiculización del aceite de chía por los procesos secado por aspersión y liofilización utilizando proteínas y polisacáridos como materiales de pared, con el fin de obtener microcápsulas con una vida útil adecuada para ser utilizadas como un ingrediente bioactivo. Se realizó un estudio comparativo de la eficiencia de microencapsulación de los procesos y las propiedades fisicoquímicas y morfológicas de las microcápsulas obtenidas; finalmente se evaluó la vida útil del aceite contenido en las microcápsulas a través de un ensayo de almacenamiento prologado. En base a las determinaciones previas realizadas, se seleccionaron e incorporaron las microcápsulas en las formulaciones de panes y pastas secas. Se realizó un análisis de los efectos de la incorporación del aceite de chía microencapsulado y sin encapsular sobre el proceso de preparación, la calidad tecnológica y la estabilidad oxidativa de los productos. Finalmente, se llevó a cabo la evaluación de las propiedades sensoriales, el contenido de ácidos grasos omega-3 y de la liberación de aceite tras condiciones gástricas e intestinales *in vitro*.

Materiales y Métodos

Extracción del aceite de chía

El aceite de chía se extrajo de semillas provenientes de la provincia de Salta (Argentina) según la metodología propuesta por Martínez et al. (2012), mediante una prensa de tornillo escala piloto (Komet Modelo CA 59 G, IBG Monforts, Alemania). Se estudió la calidad química del aceite obtenido midiendo el índice de hidroperóxido (IHP) siguiendo la metodología AOCS (2009), y la estabilidad oxidativa (EO) utilizando un equipo Rancimat (743 Rancimat METROHM, Suiza) (González et al., 2016). La composición de ácidos grasos de las muestras de aceite se analizó por triplicado para cada muestra de acuerdo con el procedimiento empleado por Martínez et al. (2012).

Obtención de microcápsulas

El proceso de microencapsulación se realizó en dos etapas, primero se formaron emulsiones del aceite de chía en la suspensión de los materiales de pared, y luego se deshidrataron las emulsiones mediante liofilización y secado por aspersión

Preparación de la emulsión

Se utilizó como materiales de pared aislado de proteína de soja (APS) y maltodextrina DE 15. Se trabajó con las siguientes relaciones proteína/polisacárido: APS 100% y APS/MD 1:1 y 1:3. Se utilizó una relación 2:1 de material de pared y aceite (Gonzalez et al., 2016, 2018 y 2020).

Secado por atomización

Se utilizó un equipo Mini Spray Dryer Büchi B 290 (BÜCHI, Suiza). Las condiciones del proceso de secado fueron las siguientes: temperatura del aire de entrada: $130\pm1^{\circ}\text{C}$; temperatura del aire de salida: $80\pm1^{\circ}\text{C}$; bomba de alimentación: 10% y aspirador: 100% ($38\text{m}^3/\text{h}$) (González et al., 2016).

Secado por liofilización

La emulsión se colocó en recipientes de plástico y se congeló en un freezer a -80°C durante 12 h y luego se liofilizó a presiones menores a 0,1 mbar y -50°C por 36h (RifcorL-T8, Argentina) (González et al., 2016).

Rendimiento de sólido recuperado

El rendimiento de sólidos recuperados (SR) se calculó como la relación del peso del polvo recolectado después de cada experimento (S_f , sólido final, base seca) y la cantidad inicial de componentes en las emulsiones preparadas (sin incluir el agua) (C_i , componentes iniciales, base seca), como se indica en la ecuación 1.

$$RS = (S_f/C_i) \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Caracterización de las microcápsulas

Se determinó el contenido de aceite superficial o libre (AS); aceite total (AT), eficiencia de encapsulación (EE%) y la eficiencia de retención (ER%) (González et al., 2016).

Se estudió la morfología en cuanto a la presencia de grietas, poros, forma y distribución de tamaños de las microcápsulas obtenidas mediante microscopía de barrido electrónico (SEM, Carl Zeiss-Sigma, Alemania) y la ubicación del aceite mediante microscopía confocal de fluorescencia (González et al., 2020).

Estabilidad oxidativa del aceite

Análisis de estabilidad oxidativa del aceite bajo condiciones aceleradas

Se evaluó la EO de los aceites microencapsulados con el Test de Rancimat (González et al., 2016). El factor de protección (FP) se definió como la relación entre el tiempo de inducción del aceite microencapsulado y el tiempo de inducción del aceite sin encapsular.

Análisis de estabilidad oxidativa del aceite en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente

Las microcápsulas y su aceite homólogo sin encapsular se colocaron en botellas de vidrio color ámbar de 250 mL de capacidad y se almacenaron en una cámara termostatzada a $20\pm3^{\circ}\text{C}$ y $60\pm5\%$ de humedad relativa. El ensayo se llevó a cabo durante 3 meses. Cada 15 días se extrajo una muestra de cada uno de los tratamientos y se determinó el IHP (Gonzalez et al., 2016).

En los productos enriquecidos, pan de molde y pasta seca, se determinó el IHP del aceite microencapsulado y sin microencapsular, inmediatamente después del proceso de preparación, durante 14 días (muestreo cada 7 días) y 150 días (muestrs cada 30 días), respectivamente (González et al., 2018 y 2020).

Digestión gastrointestinal in vitro de microcápsulas

Para estimar la cantidad de aceite de chía disponible para la absorción intestinal, se llevó adelante una digestión *in vitro* a través del paso gástrico e intestinal según (Goyal et al., 2015) con algunas modificaciones. Se colocaron 2 g de microcápsulas de aceite de chía en 30 mL de fluido gástrico simulado (FGS) que contenía cloruro de sodio y pepsina a pH 1,2 en un baño de agitación orbital durante 2 h a 37°C . Luego el pH se ajustó a 6,8 usando una solución de NaOH y se añadieron 30 mL de un fluido intestinal simulado (FIS) que contenía pancreatina en un buffer fosfato salino (PBS) a pH 6,8 y se agitó durante 2 h a 37°C . FGS y FIS se prepararon conforme a lo establecido en la Farmacopea (Pharmacopeia, 2000). Para determinar la cantidad de aceite disponible después de la digestión (%AD), los compuestos lipídicos se extrajeron realizando tres particiones con 30 mL de n-hexano. Luego, el disolvente se evaporó completamente y el aceite recuperado se determinó por gravimetría.

Procedimiento de producción de pan

La formulación de la masa base utilizada en este estudio contenía 100 g de harina de trigo, 3 g de levadura prensada, 1 g de sal, 2,5 g de azúcar, 0,3 g de estearoil lactilato de sodio, 0,02 g de α -amilasa y 56,8 g de agua. Los ingredientes se mezclaron en una mezcladora (MPZ, Argentina). La levadura, la sal y el azúcar se disolvieron por separado en agua y los ingredientes restantes se añadieron como sólidos. Se incorporaron las microcápsulas de aceite de chía (MC) (5,2 g) o aceite de chía (1,7 g) a la masa para producir pan con MC (Pan+MC) o pan con aceite libre (Pan+Aceite), respectivamente. Las muestras de pan sin aceite de chía se consideraron como panes control. La masa resultante (aproximadamente a 23°C) se cubrió con film de plástico y se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente. La masa se dividió en trozos de 165 g, los que se laminaron (BraesiMB350, Brasil) moldearon y colocaron en moldes metálicos (15x8x6 cm). Las masas se fermentaron en una cámara de fermentación (Pauna, Argentina) a 30°C y 96% HR durante 60 min. El horneado se realizó a 220°C durante 15 min en un horno convectivo (Pauna, Argentina). La temperatura en el centro de la masa durante el horneado se registró utilizando un data logger TES-1307 (Electrical Electronic Corp., Taiwán). La temperatura de la corteza del pan inmediatamente después del horneado se registró con un termómetro infrarrojo digital (Fluke-62Max, EUA). Los panes se fotografiaron con una cámara digital (Sony, Japón) y luego se almacenaron durante 14 días en bolsas de plástico selladas. Las muestras se rociaron previamente con una solución de sorbato de potasio para evitar el crecimiento de moho en la superficie de los panes.

Evaluación de la calidad tecnológica de pan

El volumen específico de pan (VEP) y la uniformidad de la miga (distribución y tamaño alveolar) se llevó a cabo según la metodología propuesta por Ribotta et al. (2001). La morfología de la miga se estudió a través de microscopía confocal de fluorescencia (LSM5 Pascal Zeiss, Alemania). Para visualizar la distribución del aceite en la microestructura de la miga, se utilizó una técnica de tinción. La fase grasa se tiñó agregando rojo nilo (Sigma-Aldrich, EUA) (1 g/kg base grasa). El análisis del perfil de textura (APT) se realizó utilizando un texturómetro según la metodología propuesta por Steffolani et al. (2010).

Análisis sensorial de pan

Los 40 evaluadores semi-entrenados fueron seleccionados de acuerdo a los siguientes criterios: edades entre 25 y 55 años; personas sin alergias alimentarias; no fumadores; consumidores habituales de pan e interesados en participar (Plemmons y Resurreccion, 1998). Se utilizó una escala hedónica de 9 puntos para indicar los grados de desagradable de cada atributo con respecto a la muestra control. Se sirvió una rebanada de cada pan a cada juez. La prueba se llevó a cabo 24 h después de la cocción. Se analizaron cinco atributos: aspecto general, olor, textura, sabor y aceptabilidad general. Para conocer el orden de preferencia de las muestras de pan incluyendo el control, se realizó una prueba de preferencia (1=muestra más aceptada y 3=muestra menos aceptada) (González et al., 2018).

Procedimiento y formulaciones de producción de pasta

Las muestras de pasta se elaboraron según la formulación propuesta por Bustos et al. (2011). Se utilizaron como ingredientes principales 50 g de harina de trigo "0000", 500 mg de sal (NaCl) y agua. La pasta se amasó durante 20 min con agua (25-30% de humedad), a continuación, se llevó la masa a un proceso de extrusión cuya temperatura no superó los 40-45°C. La masa fue moldeada con cortes finos de 14 cm por 2 mm de espesor (Monferrina, DOLLY Pasta Extruder). Las pastas se secaron a diferentes temperaturas: el primer ciclo fue de 15 a 30 min a 30°C con convección forzada de aire y el segundo ciclo fue a 45°C durante 17,5 h bajo una atmósfera con 75% de humedad relativa. Las muestras fueron almacenadas en recipientes plásticos herméticos a temperatura ambiente hasta su análisis. La cantidad de aceite agregado a cada formulación se determinó según la ingesta diaria recomendada de omega-3 para un adulto sano especificada anteriormente. Por lo tanto, teniendo en cuenta: i) el valor de referencia; ii) el contenido de ácido graso omega-3 en aceite de chía (0,6 mg/g de aceite) y iii) el contenido de aceite total en 1 g de microcápsulas (MC) obtenidas por liofilización (0,33 g), se elaboraron las pastas secas con la cantidad de aceite necesario para satisfacer, en una porción de 100 g de producto, el 100% del valor de ingesta recomendado. Se prepararon 3 formulaciones: una control (sin aceite), una con aceite libre y una con aceite microencapsulado (González et al., 2020). La pasta formulada con aceite libre se le incorporó APS en la proporción que hubiera sido agregada formando parte del material de pared.

Determinación de las propiedades tecnológicas y de textura de la pasta

El tiempo óptimo de cocción (TOC) se determinó acorde al método 50-66.01 (AACC, 1995); la absorción de agua (AA) y el índice de hinchamiento (IH) se evaluaron según la metodología descrita por Tudorică et al. (2002); el residuo de cocción (RC) se determinó acorde al método 16-50 (AACC, 1995).

La determinación de textura del producto se llevó a cabo con un texturómetro Instron (Universal Testing Machine, modelo 3342, EUA) (Gonzalez et al., 2020). Se obtuvo la dureza de la pasta expresada como la fuerza máxima requerida para fracturar la pasta.

Microestructura de pasta seca y cocida

El estudio de la microestructura de la pasta se realizó siguiendo la misma metodología descripta para panes de molde (Gonzalez et al., 2018 y 2020).

Análisis estadístico

Se utilizó el programa INFOSTAT versión 2011 profesional (Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) como base informática. Para cada uno de los parámetros físicos y químicos estudiados, se realizó análisis de la varianza (ANOVA). En aquellos casos donde se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), se utilizó un test a posteriori de comparaciones múltiples de LSD Fisher. Todos los ensayos se llevaron a cabo como mínimo por triplicado.

Resultados y discusión

Preparación y caracterización de las microcápsulas

El análisis macroscópico, evidenció que las muestras obtenidas por aspersión o atomización se asemejaban a un polvo fino, mientras que las obtenidas por liofilización eran más compactas y con escamas. Por otro lado, las imágenes de la microestructura obtenidas mediante SEM (Figura 1) revelaron que las microcápsulas obtenidas por atomización pueden ocurrir individualmente o pueden formar grupos o agregados, exhibiendo un rango de tamaño que varía de 4 a 10 μm . Todas las muestras presentaron una estructura superficial continua y homogénea con baja rugosidad y sin poros ni fracturas aparentes. Las microcápsulas de APS revelaron una forma de esfera desinflada con depresiones en sus superficies; mientras que las microcápsulas de APS/MD tuvieron una forma más esférica. Este último efecto fue más notorio cuando aumentó la proporción de MD en el material de pared. Se han descrito morfologías similares en la literatura para otros materiales secados por aspersión y liofilización (Sousdaleff et al., 2013; Zhang et al., 2014). La ausencia de porosidad es una causa importante de conservación por oxidación (Ahn et al., 2008).

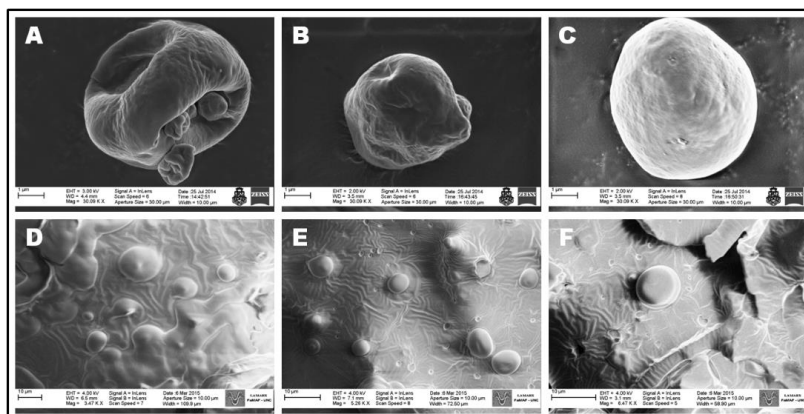


Figura 1. Micrografías SEM de microcápsulas APS (A), APS/MD 1:1 (B) y APS/MD 1:3 (C) obtenidas por secado por aspersión y APS (D), APS/MD 1:1 (E) y APS/MD 1:3 (F) obtenidas por liofilización.

La cantidad de sólidos recuperados (SR) fue significativamente menor en las muestras obtenidas por atomización respecto a las liofilizadas (Tabla 1), debido fundamentalmente a la considerable cantidad de sólidos que quedan adheridas en la cámara de secado durante la atomización. A su vez, a las MC obtenidas por ambas tecnologías se les determinó el contenido de aceite total (AT) y la eficiencia de encapsulación (EE) (Tabla 1).

Tabla 1. Sólido recuperado (SR), aceite total (AT) y eficiencia de encapsulación (EE) de muestras de APS y APS/MD obtenidas mediante procesos de secado por aspersión y liofilización.

Proceso de secado	Muestra	SR (%)	AT(g/g _{sólidos})	EE (%)
Aspersión	APS	50,4±5,7 ^A	0,26±0,04 ^A	57,3±2,9 ^A
	APS/MD 1:1	46,6±7,8 ^A	0,25±0,05 ^A	60,2±3,9 ^A
	APS/MD 1:3	38,7±5,9 ^A	0,23±0,03 ^A	52,5±4,9 ^A
Liofilización	APS	97,9±1,8 ^B	0,31±0,02 ^A	61,1±10,1 ^A
	APS/MD 1:1	96,6±1,0 ^B	0,26±0,04 ^A	59,6±9,9 ^A
	APS/MD 1:3	98,1±2,2 ^B	0,35±0,05 ^A	65,5±1,1 ^A

Media±SD en la misma columna seguida por una misma indica que no hay diferencia estadísticamente significativa ($P \geq 0.05$).

Los resultados de AT y EE obtenidos revelaron que los materiales de pared a base de proteína de soja fueron agentes de retención y de protección efectivos (con una relación material de pared:aceite de 2:1) en ambos procesos, dado que resultaron cercanos a la cantidad de aceite inicial añadida a la emulsión (0,33 g/g de sólidos) y del orden del 60%; respectivamente (González et al., 2016).

Estudio de estabilidad oxidativa del aceite

La Tabla 2 muestra los valores de TI y FP para las muestras APS y APS/MD 1:1 y 1:3 preparadas mediante los métodos de secado por aspersión y liofilización.

Tabla 2. Valores de tiempo de inducción (TI) y factor de protección (FP) obtenidos para muestras APS y APS/MD 1:1 y 1:3 obtenidas mediante procesos de secado por aspersión y liofilización.

Proceso de secado	Muestra	TI(h)	FP
-----	Aceite de chía (AC)	2,40±0,38 ^A	-----
Aspersión	APS	6,40±0,01 ^B	2,67
	APS/MD1:1	5,96±0,04 ^B	2,48
	APS/MD1:3	6,20±0,20 ^B	2,58
Liofilización	APS	6,24±0,24 ^B	2,60
	APS/MD1:1	5,22±0,05 ^B	2,18
	APS/MD1:3	5,97±0,76 ^B	2,49

Media±SD en la misma columna seguida por una misma indica que no hay diferencia estadísticamente significativa ($P \geq 0.05$).

Los aceites microencapsulados presentaron valores de TI y FP entre 2 a 3 veces superiores al AC sin encapsular. Estos resultados demostraron que los materiales de pared constituyen

una barrera eficaz contra la degradación oxidativa del AC, probablemente reduciendo el flujo de calor y oxígeno a las gotitas de aceite. A su vez, no se observaron diferencias significativas entre los valores de TI de los aceites encapsulados al variar el método de secado o la proporción de los biopolímeros.

En la Figura 2 se muestran los resultados del ensayo de almacenamiento durante 90 días en una cámara termostatzada a $20 \pm 3^\circ\text{C}$ y $60 \pm 5\%$ HR del AC sin encapsular y de las microcápsulas preparadas por atomización y liofilización.

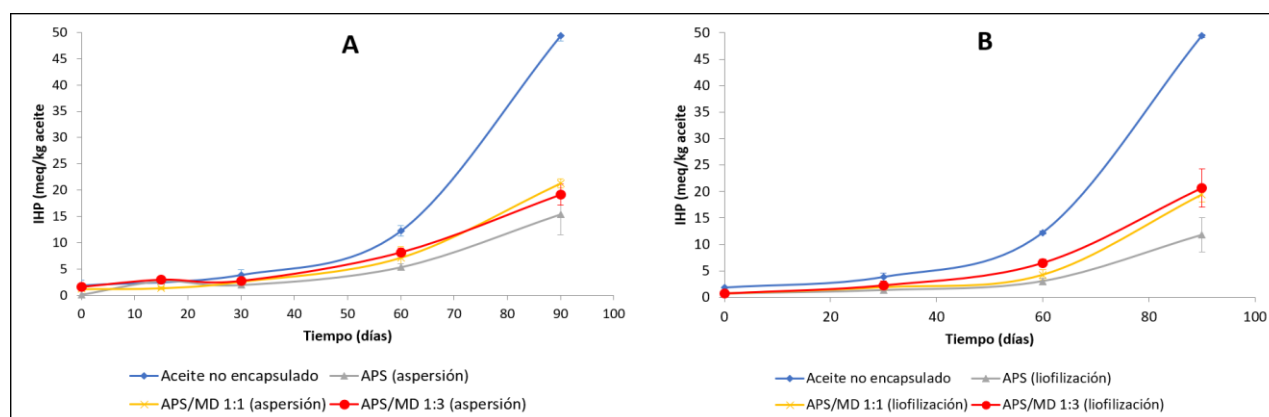


Figura 2. Índice de hidroperóxidos (IHP) a diferentes tiempos de almacenamiento para muestras APS, APS/MD 1:1 y APS/MD 1:3 secadas por aspersión (A) y APS, APS/MD 1:1 y APS/MD 1:3 muestras secadas por liofilización (B).

La Figura 2 muestra que el IHP aumentó gradualmente con el tiempo de almacenamiento. Además, se pudo observar que el AC sin encapsular alcanzó el punto final de rancidez (límite de aceptabilidad para los aceites vegetales vírgenes y prensados en frío 15 meq.O₂/kg de aceite, Codex Alimentarius, 2001) en un tiempo notablemente más corto que sus homólogos encapsulados (alrededor de 20 a 30 días antes). Este resultado representó un aumento en el tiempo de vida útil del aceite de entre un 30 y un 48%. Los resultados demuestran que los biopolímeros constituyentes del material de pared son una barrera eficaz contra la degradación oxidativa del AC. Al comparar los resultados obtenidos para las diferentes muestras, se pudo observar que no se encontraron variaciones significativas entre las muestras sometidas a secado por aspersión y liofilización. Sin embargo, si se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a la composición del material de pared, siendo las MCs constituidas sólo por APS las que presentaron la mayor estabilidad oxidativa. Por lo anteriormente expuesto, para el enriquecimiento de omega 3 de los panes y pastas secas se seleccionaron las MCs conformadas sólo por APS y obtenidas por liofilización. Por su parte, el ensayo de digestibilidad *in vitro* de estas MC demostró que el $94,83 \pm 2,57\%$ del aceite originalmente contenido en las mismas se libera y se encuentra disponible para su potencial absorción en el intestino después de su paso por el tracto gastrointestinal. A su vez, los perfiles de ácidos grasos de los aceites extraídos de las MC antes y después de la digestión *in vitro* no mostraron diferencias significativas, lo que sugiere que las condiciones gastrointestinales simuladas no alteran las características químicas del aceite (González et al., 2016).

Elaboración de pan de molde y pastas secas a base de harina de trigo enriquecidos con ácidos grasos omega 3

Se incorporaron las MCs y AC sin encapsular como ingrediente en la formulación de la masa para preparar pan de molde enriquecido con omega-3. Se prepararon 3 formulaciones:

Pan+MC, Pan+AC libre y Pan sin aceite (control). La temperatura interna del pan (miga) y la corteza (superficie de la pieza) alcanzaron valores de $95,0\pm0,6^{\circ}\text{C}$ y de $154\pm2^{\circ}\text{C}$ respectivamente, al final del proceso. El aspecto macroscópico de los panes mostró superficies de colores homogéneos y estructuras uniformes de miga sin formación de alvéolos colapsados. El pan que contenía AC libre mostró la relación de dimensiones más elevada (alto/ancho) $0,84\pm0,06$ mientras que el pan control y el Pan+MC mostraron valores de relación de $0,79\pm0,04$ y $0,78\pm0,03$; respectivamente (Figura 3).



Figura 3. Aspecto macroscópico de las piezas y rebanadas de pan.

Para determinar si la presencia de MC o AC libre afectaba la calidad del pan, se midieron una serie de propiedades asociadas a la calidad del producto. En concordancia con Cauvain (2012), la adición de AC sin encapsular aumentó significativamente el volumen específico y el área ocupada por los alvéolos con respecto al área total, mientras que esto no se alteró con la incorporación de MC (Tabla 3). A pesar de que las formulaciones de pan generalmente contienen niveles bajos (<5%) de aceite o grasa agregados, éstos afectan tanto el procesamiento como la calidad sensorial. La grasa plastifica y lubrica la masa y aumenta la elevación de la masa y el volumen del pan; a su vez afecta la estructura de la miga, ablanda el pan horneado y prolonga la vida útil o mantiene la calidad (Pareyt et al. (2011).

Se sabe que las variaciones en el volumen específico de los panes provocan cambios en el alveolado, ya que el aumento de la proporción de aire contenido en el interior de la miga incrementa el volumen de los panes. Esto se corroboró determinando el tamaño alveolar y el porcentaje del área ocupada por los mismos, mediante el análisis de imágenes de las rebanadas de pan.

Tabla 3. Volumen específico de pan (VEP) y los parámetros estructurales de la miga. %AC: porcentaje de área ocupada por los alveolos con respecto al área total.

	Pan Control	Pan+MC	Pan+Aceite
VEP (cm³/g)	3,549±0,511 A	3,389±0,105 A	4,083±0,192 B
%AC (%)	39,0±2,9 A	37,2±1,0 A	41,4±1,0 B
Área alveolar (cm²)	0,018±0,003 AB	0,016±0,001 A	0,019±0,002 B
Uniformidad de la miga	8,73 ±1,05 A	11,71±1,68 B	8,34±1,38 A

Media±SD en la misma fila seguida por una misma indica que no hay diferencia estadísticamente significativa ($P\geq0,05$).

Se puede observar que la muestra de Pan+Aceite tuvo los valores más altos de porcentaje de área ocupada por celdas de aire en relación al área total, volumen específico y área

alveolar. Mientras que, el Pan+MC mostró un área alveolar promedio más baja que el Pan+Aceite, lo que generó un aumento en la uniformidad de la miga. La textura del pan se estudió mediante análisis de perfil de textura (APT). Se determinaron propiedades como dureza, masticabilidad, elasticidad y cohesividad para evaluar el efecto de la adición de las MC y el AC sin encapsular sobre la textura del pan producido. Los resultados se pueden ver en la Figura 4.

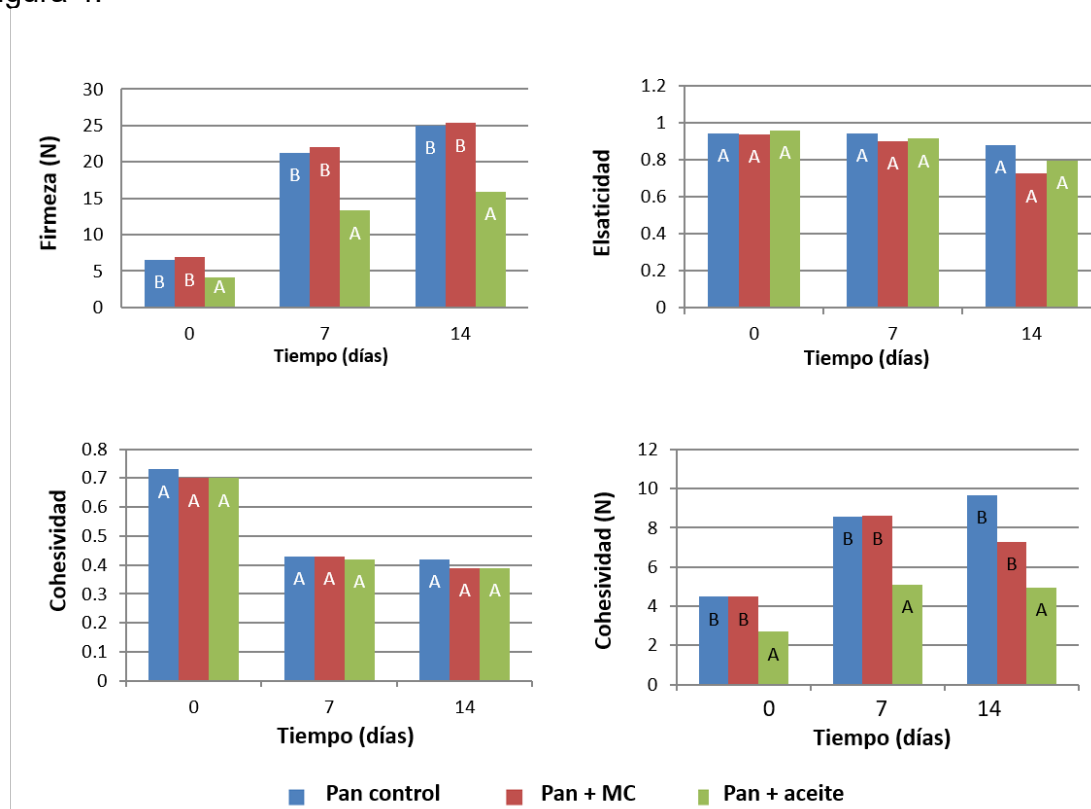


Figura 4. Parámetros de textura obtenidos para Pan+MC, Pan+Aceite y Pan Control a los 0, 7 y 14 días de almacenamiento.

La presencia de aceite sin encapsular afectó la firmeza de los panes y por ende la masticabilidad, produciendo panes más blandos, mientras que no produjo variaciones significativas en elasticidad y cohesividad. Por el contrario, la adición de aceite microencapsulado no modificó la textura de los panes en comparación con el pan control.

El efecto del tiempo de almacenamiento mostró, como era de esperar, un aumento de la dureza y masticabilidad y una disminución de la elasticidad y cohesividad. A los 7 y 14 días de almacenamiento, el efecto producido por la adición de aceite sin encapsular fue más marcado, ya que la firmeza y masticabilidad tuvieron menor tasa de incremento en comparación con el pan control y Pan+MC. Los resultados sugirieron que la adición de AC sin encapsular mejoró las propiedades de textura de los panes durante todo el tiempo de almacenamiento. Este efecto es bien conocido y descrito en la literatura (Cauvain, 2012). Por otro lado, la adición de las MC no modificó las propiedades de textura de los panes, lo que es esperado ya que el propósito de la microencapsulación es el enriquecimiento del pan con componentes saludables sin afectar su calidad tecnológica. Se informó un comportamiento similar en la literatura para el aceite de pescado encapsulado usando proteínas de soja como material de pared (Davidov-Pardo et al., 2008). En contraste, para panes con el agregado de aceite de semilla de lino con almidón de maíz alto en amilosa como material de pared, se informó un aumento lineal en los valores de dureza y masticabilidad con un incremento continuo del contenido de microcápsulas. Además, se informó una disminución en VEP y el

número de alvéolos y tamaño. Los autores atribuyen este efecto a una dilución del contenido de gluten (Gökmenetal., 2011).

La Figura 5 muestra las imágenes microscópicas obtenidas mediante microscopía confocal. Estas evidencian la presencia y la distribución de MC y aceite libre en las migas debido a su tinción específica con rojo nilo como fluoróforo de compuestos grasos.

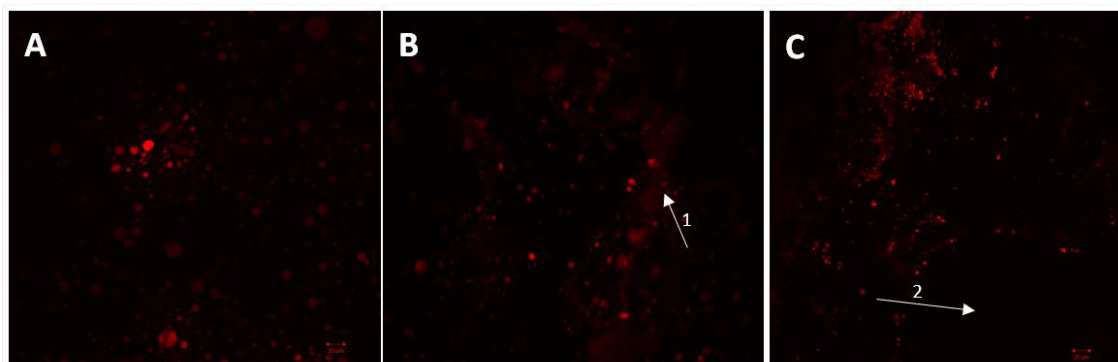


Figura 5. Micrografías confocales de MC (A) y migas de Pan+MC (B) y Pan+Aceite (C).

Las micrografías mostraron al aceite microencapsulado disperso de manera homogénea en la matriz. En un trabajo previo, las microcápsulas obtenidas por liofilización fueron descritas como aglomerados o escamas de proteínas de soja incluyendo gotitas de aceite (González et al., 2016). Por tal motivo, el Pan+MC mostró gotitas de aceite de diferentes tamaños y una distribución no homogénea, que puede estar asociada a la presencia de estos aglomerados o escamas con alto contenido de gotitas de aceite (flecha 1 en la Figura 5B). Como se esperaba, en áreas donde estas estructuras no están presentes, no se observaron gotas de aceite. Por otro lado, las muestras de Pan + Aceite mostraron una distribución más homogénea de gotas de aceite en toda la miga y las mismas fueron más pequeñas. Las áreas oscuras de las micrografías de Pan+Aceite corresponden a las áreas donde se encuentran los alvéolos (flecha 2 en la Figura 5C). La Figura 5 muestra sólo una imagen para cada muestra, pero los efectos explicados fueron representativos de todas las imágenes capturadas.

Dado que el comportamiento de las pastas durante y después de la cocción es de particular importancia para los consumidores, se midieron las propiedades tecnológicas del producto para determinar si la incorporación de MC o AC libre afecta su calidad.

El tiempo óptimo de cocción (TOC) fue de 6 min para todas las muestras y no fue afectado por la incorporación de MC o AC libre, siendo este valor adecuado para este tipo de producto. El residuo de cocción (RC), uno de los principales parámetros de calidad de una pasta, mostró valores entre 5,3-5,6g/100 g de pasta seca, sin presentar diferencias significativas entre las muestras (Tabla 4). Por su parte, el valor de RC resultó inferior al límite máximo establecido para una de pasta de trigo duro (8%). La absorción de agua (AA) varió entre 137,15 y 167,58%, y las muestras de Pasta+MC y Pasta+AC (Tabla 4) mostraron valores de AA significativamente más bajos que la pasta Control. Estos resultados evidencian que, durante la cocción, la absorción del agua por parte de las proteínas y el almidón fue diferente en la pasta fortificada. Los menores porcentajes de AA obtenidos para las muestras de Pasta+MC y Pasta+Aceite pueden deberse a la presencia de APS, que podría modificar la distribución del agua, reduciendo su disponibilidad para la gelatinización del almidón durante la cocción (Sozer y Kokini, 2009). Además, se conoce que la presencia de lípidos en estos productos reduce la AA debido a que los lípidos forman complejos con la amilosa (Badui, 2006). Se

observaron tendencias similares para los valores del IH, donde el valor más alto, 2,12 g de agua/g de pasta seca, correspondió a la pasta Control. La disminución en el IH de la pasta podría atribuirse a la red de proteínas formada que limita la hidratación del almidón. Durante la cocción, las proteínas y el almidón compiten fuertemente por el agua, ya que la desnaturalización de las proteínas comienza aproximadamente a la misma temperatura que la gelatinización del almidón. Las proteínas requieren agua para coagular y formar una red, mientras que el almidón la absorbe, se hincha, gelatiniza y tiende a solubilizarse (Martínez, 2010). Este efecto produce una disminución en la disponibilidad de agua para el almidón que se evidencia en un IH más bajo.

Tabla 4. Parámetros de calidad de la pasta en las diferentes formulaciones.

Muestra	TOC (min)	RC % p/p	AA % p/p	IH (g agua / g pasta seca)
Pasta Control	6,0±0,5	5,28±0,20 a	167,58±8,90 b	2,12±0,10 b
Pasta+MC	6,0±0,5	5,46±0,10 a	141,40±6,20 a	1,74±0,10 a
Pasta+AC	6,0±0,5	5,60±0,10 a	137,15±5,30 a	1,79±0,10 a

Media±SD en la misma columna seguida por una misma indica que no hay diferencia estadísticamente significativa ($P \geq 0,05$). TOC (tiempo óptimo de cocción), RC (residuo de cocción), AA (absorción de agua), IH (índice de hinchamiento).

La textura de una pasta es una de las características que determina su aprobación final por parte de los consumidores. Los resultados demuestran que la firmeza de la pasta seca cruda es afectada por la composición del producto. De hecho, Pasta+MC y Pasta+AC, mostraron una resistencia a la fractura significativamente menor que la pasta Control (Tabla 5). Esto podría deberse a que la porción de aceite de la superficie produciría un efecto lubricante en la matriz de la pasta. Por su parte, la pasta cocida presentó un comportamiento diferente, dado que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras en los parámetros firmeza y adhesividad (Tabla 5). Estos resultados están en concordancia con Aranibar et al., 2018 que estudiaron el efecto de la incorporación de una harina de chíá parcialmente desaceitada en la formulación de pasta de trigo. Los autores observaron una disminución estadísticamente significativa en la firmeza del producto crudo con el aumento de la proporción de la harina parcialmente deslipidizada; sin embargo, no observaron diferencias estadísticamente significativas entre las formulaciones de pasta cocida. Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la incorporación de esta cantidad de aceite microencapsulado o libre en el producto no afectaría negativamente las propiedades tecnológicas y de textura de la pasta cocida.

Tabla 5. Propiedades texturales de las muestras de pasta antes y después de la cocción.

Muestra	Pasta cruda	Pasta cocida	
	Fuerza de ruptura(N)	Firmeza (N)	Adhesividad (mJ)
Pasta Control	2,71±0,23A	7,65±0,42A	0,32±0,03A
Pasta+MC	1,46±0,19B	6,93±0,55A	0,28±0,04A
Pasta+AC	1,17±0,19B	7,01±0,59A	0,29±0,04A

Valores medios±DE (n = 6). Los valores de cada columna seguidos de una letra mayúscula idéntica en superíndice no representan diferencias significativas ($p \geq 0,05$).

La microestructura de las pastas con el agregado de MC y AC libre se analizó mediante SEM. Las muestras de pasta seca mostraron gránulos de almidón tipo A y B de entre 10 a 20 μm y de entre 3 a 5 μm de diámetro, respectivamente, sin revelar diferencias aparentes entre las tres pastas preparadas. Es importante aclarar que en la pasta con MC, estas estructuras no se pudieron observar con claridad, ya que su forma y tamaño son similares a los de los gránulos de almidón tipo B. Sin embargo, es posible ver un aumento en el número de estas estructuras, algunas de ellas sin forma esférica, probablemente atribuidas a la presencia de las MC. Por otro lado, en la pasta cocida, no se encontraron diferencia entre las muestras. Sin embargo, la pasta cocida mostró superficies lisas en comparación con la pasta seca, debido probablemente a la presencia de gránulos de almidón hinchados que los torna menos perceptibles. Además, en la pasta cocida, se pudieron observar regiones porosas, posiblemente atribuidas a la liberación de gránulos de almidón durante la cocción.

Para diferenciar las MC de los gránulos de almidón tipo B, se realizó una microscopía confocal de fluorescencia (Figura 6). La pasta seca control presentó pequeñas cantidades de lípidos provenientes de la harina de trigo incluida en la matriz. En cuanto a la pasta seca y cocida con AC no encapsulado, se observó una distribución heterogénea de la fase lipídica formando estructuras amorfas de tamaño importante. Finalmente, en la pasta seca y cocida con MC, el aceite se distribuyó en la matriz en pequeñas gotas, formando parte de microcápsulas. Esto se demuestra mediante la superposición de imágenes ópticas y confocales. A su vez, la muestra cocida evidenció una pequeña cantidad de aceite libre posiblemente asociado a la liberación de la matriz de la MC durante la cocción. Estos resultados fueron similares a los observados por Gallardo et al. (2013) en pan enriquecido con aceite de lino microencapsulado.

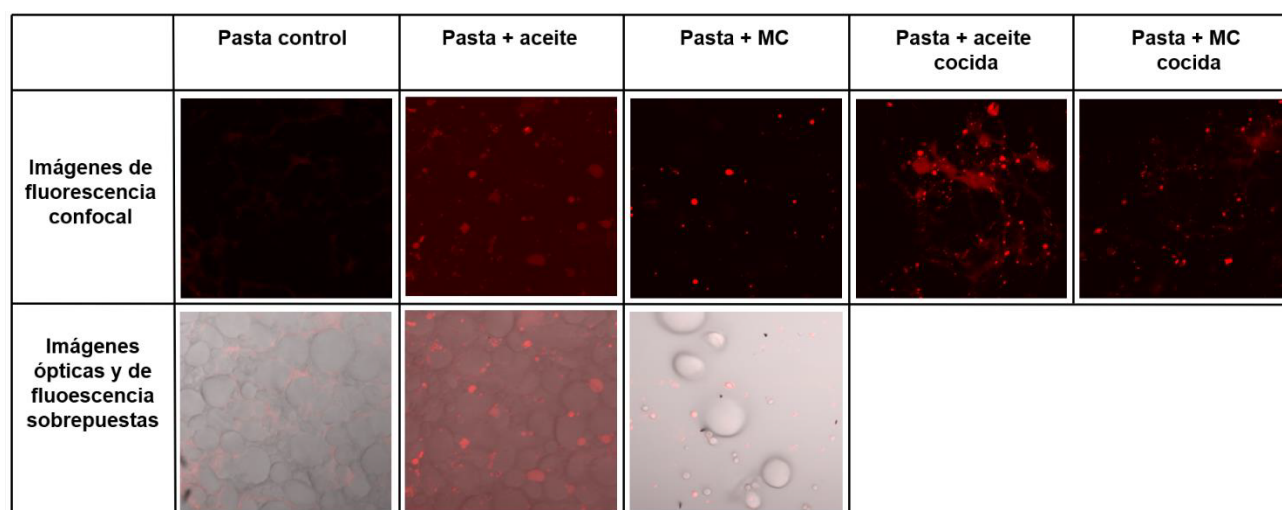


Figura 6. Imágenes ópticas y de fluorescencia confocal de muestras de pastas secas y cocidas: Pasta control, Pasta+MC y Pasta+Aceite.

Evaluación de la calidad química del aceite contenido en los productos enriquecidos

En los panes de molde, el IHP no mostró evidencia de oxidación del aceite cuando fue incorporado microencapsulado. De hecho, no se encontraron diferencias entre el aceite control (obtenido por prensado en frío) y el aceite extraído de las muestras de Pan+MC después del horneado. En contraposición, el aceite extraído de las muestras de Pan+Aceite presentó valores de IHP significativamente superiores al aceite extraído de las muestras de Pan+MC. Esto muestra claramente el efecto protector del material de pared frente a las condiciones de procesamiento del pan. Por su parte, el ensayo de almacenamiento del pan de molde durante 14 días, demostró que la microcápsula preserva del deterioro oxidativo al aceite contenido en el pan, ya que el IHP aumentó a una tasa menor respecto a su contraparte sin encapsular.

Tabla 6. Índice de hidroperóxido (meq/kg aceite) de los aceites extraídos de los panes, de microcápsulas antes de ser añadidos a la preparación de pan (MC) y aceite control utilizado sin encapsulación.

	Día 0	Día 7	Día 14
Pan Control	0,36±0,08 A	0,19±0,06 A	0,34±0,09 A
Pan+MC	0,46±0,11 A	1,29±0,34 A	2,10±0,21 B
Pan+Aceite	4,81±0,35 B	4,55±0,36 B	7,15±0,69 C
Aceite de MC	0,56±0,14 A	Nd	nd
Aceite Control	0,57±0,13 A	Nd	nd

Valores medios±DE (n = 3). Los valores de cada columna seguidos de una letra mayúscula idéntica en superíndice no representan diferencias significativas ($p \geq 0,05$). nd: sin datos

Los resultados obtenidos de la medición de los perfiles de ácidos grasos mostraron una disminución de aproximadamente 16% y 13% de ácido α -linolénico (omega-3) en las muestras de Pan+Aceite y Pan+MC, respectivamente, en comparación con el aceite control (Tabla 7). Esta mínima reducción en el ácido graso esencial omega-3 evidencia que a pesar

de que el mismo se encuentra vehiculizado y protegido en una matriz sólida, el proceso de horneado afecta parcialmente su biodisponibilidad.

Tabla 7. Determinación del perfil de ácidos grasos (g/Kg de aceite) de los aceites de chía extraídos de las 3 formulaciones de panes, de las MC y de las MC digeridas bajo condiciones gastrointestinales simuladas

Ácidos grasos	Pan Control	Pan+MC	Pan+Aceite	Aceite MC	Aceite Digerido
Palmítico 16:0)	71,8±0,4 B	91,9±6,7 C	90,9±3,5 C	64,8±0,5 A	71,8±0,1 B
Palmitoleico (16:1)	0,5±0,0 C	0,5±0,1 C	0,5±0,1 C	0,2±0,0 B	0,5±0,0 C
Esteárico (18:0)	28,1±0,1 B	42,3±2,1 D	28,2±0,7 B	33,9±0,1 C	28,4±0,9 B
Oleico (18:1)	74,4±0,5 C	81,9±1,7 D	89,3±1,1 E	69,5±0,4 B	74,3±0,4 C
Linoleico (18:2)	210,2±0,6 A	249,1±9,1 D	271,2±5,1 E	226,2±1,1 C	210,0±0,1 A
α-linolénico (18:3)	610,0±3,9 C	528,7±10,6 A	515,8±8,6 A	599,4±4,3 C	609,1±5,2 C
Araquidónico (20:0)	2,9±0,1 B	3,1±0,7 B	1,5±0,4 A	3,8±0,2 C	2,9±0,1 B
Eicosanoico (20:1)	3,2±0,3 C	2,4±1,0 B	2,9±0,1 C	2,2±0,1 B	1,7±0,4 A

Valores medios±DE (n = 3). Los valores de cada fila seguidos de una letra mayúscula idéntica en superíndice no representan diferencias significativas ($p \geq 0,05$).

Resulta importante resaltar que el material de pared seleccionado en el presente trabajo demostró buenas propiedades de barrera bajo las condiciones de proceso evaluadas, comparado con Gallardo et al. (2013) quienes informaron una reducción cercana al 67% del omega-3 en panes enriquecidos con aceite de lino microencapsulado con goma arábica.

En lo que respecta a la estabilidad oxidativa de los aceites contenidos en las pastas secas y cocidas (Pasta+MC y Pasta+Aceite), se observó un IHP muy bajo en la pasta seca con MC, lo que sugiere una generación de productos primarios de oxidación reducida tanto durante el proceso de microencapsulación como de preparación del producto (Tabla 8). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el valor IHP del aceite obtenido de muestras secas de Pasta+MC y el aceite control (aceite de calidad óptima extraído por prensado en frío). Por el contrario, el aceite extraído de muestras secas de Pasta+Aceite mostró un IHP significativamente mayor que el aceite obtenido de las muestras de Pasta+MC, evidenciando un efecto negativo del proceso de producción de la pasta sobre la estabilidad química del aceite. Si bien, el proceso de cocción aumentó el IHP de ambas muestras de pasta; este incremento fue significativamente superior en la pasta con el AC agregado sin encapsular. Los resultados demuestran que el material de pared ejerce un efecto protector frente a las condiciones de elaboración y cocción de la pasta.

Tabla 8. Valores de IHP (meqO₂/kg de aceite) del aceite contenido en las formulaciones de pastas antes y después de la cocción.

Muestra	IHP	
	Pasta seca	Pasta cocida
Pasta+MC	0,48±0,10 aA	0,68±0,02 bA
Pasta+Aceite	1,14±0,10 aB	3,31±0,30 bB
Aceite Control	0,37±0,03 A	

Valores medios±DE (n = 3). Los valores de cada fila seguidos de una letra minúscula idéntica no representan diferencias significativas ($p \geq 0,05$). Los valores de cada columna seguidos de una letra mayúscula idéntica no representan diferencias significativas ($p \geq 0,05$).

El ensayo de almacenamiento prolongado bajo condiciones de anaquel se llevó a cabo envasando las pastas en envases de barrera en presencia de aire (atmósfera sin modificar) y en atmósfera de nitrógeno (atmósfera modificada). Los resultados mostraron que todos los valores de IHP fueron inferiores al límite de aceptación del Codex para los aceites vegetales vírgenes y prensados en frío (15 miliequivalentes de O₂/kg de aceite) (Codex alimentarius 2001). Del análisis global del ensayo, se observa que tanto la matriz de la pasta, como el material de pared de las MC y la atmósfera modificada contrarrestan el deterioro oxidativo del aceite de chía. La muestra de Pasta+MC envasada en atmósfera modificada mostró la mayor estabilidad oxidativa, con un IHP de $2,34 \pm 0,11$ meqO₂/kg de aceite (Figura7).

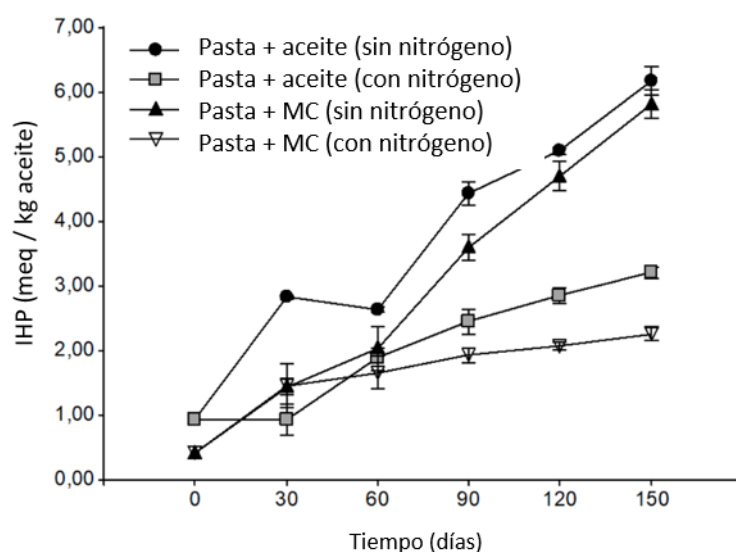


Figura 7. Evolución de IHP vs tiempo de almacenamiento para muestras de Pasta+MC y Pasta+Aceite envasadas en atmósfera modificada (N₂) y sin modificar (aire).

Finalmente, con el objeto de encontrar diferencias o similitudes sensoriales en los productos enriquecidos comparados con los tradicionales se seleccionó al pan de molde como matriz modelo. Se realizó un análisis sensorial de los productos Pan+MC y Pan+Aceite comparados con el Pan Control. El estudio se llevó a cabo con 40 evaluadores semi-entrenados y se evaluaron cinco atributos: aspecto general, olor, textura, sabor y aceptabilidad general (Tabla 9). El análisis estadístico multivariado demostró que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los panes enriquecidos y el control. Sin embargo, el

análisis de varianza individual mostró que en los atributos olor y textura las muestras enriquecidas presentaron diferencias significativas respecto al control. También se pudo observar que ambas muestras mostraron valores entre 5 y 7 en todos los atributos evaluados, lo que significa que ambos panes con aceite de chía (encapsulado y sin encapsular) presentaron buenas propiedades sensoriales y aceptabilidad general.

Tabla 9. Resultados del análisis sensorial de las muestras con respecto al pan control donde los puntos 5, 6 y 7 punto representan “me gusta”, “me gusta un poco” y “me gusta moderadamente”, respectivamente.

Muestra	Aspecto general	Olor	Textura	Sabor	Aceptabilidad general
Pan+MC	6,85±1,23 A	5,10±1,08 A	6,39±0,99 B	5,48±1,16 A	6,06±1,41 A
Pan+Aceite	6,25±1,32 A	5,73±1,23 B	5,75±1,22 A	5,5±1,23 A	6,26±1,12 A

Valores medios±DE (n = 3). Los valores de cada columna seguidos de una letra mayúscula idéntica no representan diferencias significativas ($p \geq 0,05$).

Al concluir la evaluación sensorial, se informó a los jueces las características de las muestras ensayadas y el 95 % de ellos afirmaron que consumirían el pan enriquecido con omega 3.

Conclusiones

Los procesos de microencapsulación del aceite de chía (*Salvia hispanica* L.) evaluados en esta investigación fueron capaces de producir polvos ricos en omega-3 que pueden ser utilizados como ingredientes para formular alimentos enriquecidos. Las microcápsulas seleccionadas se incorporaron a las preparaciones de pan de molde sin alterar su calidad tecnológica. A su vez, la microencapsulación mostró un efecto protector frente a la oxidación del aceite y evitó la formación de radicales hidroperóxido, generando un producto final seguro. Por su parte, la evaluación sensorial mostró el alto grado de aceptación de los productos enriquecidos respecto al tradicional. De hecho, el 95% de los evaluadores afirmó que consumiría el pan enriquecido con omega 3. Teniendo en cuenta la cantidad de ácido α -linolénico incorporada y la fracción de aceite disponible luego del ensayo de digestibilidad gastrointestinal *in vitro* simulada, se podría inferir que una ración de pan con MC (4 rebanadas de 2 cm y 15 g cada una) aporta el 60% de la ingesta diaria recomendada de ácidos grasos omega-3 para un adulto sano (aproximadamente 627 mg de ácido α -linolénico por ración diaria de pan). Por otro lado, la adición de aceite de chía microencapsulado a pastas secas resultó muy positiva dado que el único parámetro tecnológico que modificó ligeramente fue la textura de la pasta seca cruda. El efecto protector que proporciona la microencapsulación sobre el aceite de chía se pudo determinar durante la preparación, el almacenamiento y la cocción de la pasta. La atmósfera modificada con nitrógeno proporciona una protección adicional de los lípidos contenidos en la matriz, potenciando el efecto protector del material de pared. En resumen, los resultados de la presente investigación demuestran que la microencapsulación del aceite de chía en una matriz sólida bajo las condiciones estudiadas constituye un excelente vehículo para desarrollar alimentos enriquecidos con omega-3. Estos desarrollos representan una contribución para mejorar la calidad de la dieta produciendo beneficios en la salud y en la calidad de vida de las personas.

Bibliografía

- Ahn, J. H., Kim, Y. P., Lee, Y. M., Seo, E. M., Lee, K. W. y Kim, H. S. (2008). Optimization of microencapsulation of seed oil by response surface methodology. *Food Chem.*, 107, 98–105.
- American Association of Cereal Chemists (AACC). (1995). *Approved methods of the AACC. Methods*, St. Paul, USA: American Association of Cereal Chemists.
- AOCS. (2009). *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society* (5th ed.). Champaign, IL, USA: AOCS Press.
- Aranibar, C., Pigni, N. B., Martinez, M., Aguirre, A., Ribotta, P., Wunderlin, D. y Borneo, R. (2018). LWT - Food Science and Technology Utilization of a partially-deoiled chia flour to improve the nutritional and antioxidant properties of wheat pasta. *LWT - Food Science and Technology*, 89(November 2017), 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.003>
- Badui, D. . (2006). *Química de los alimentos*. México. Pearson Educación de México.
- Barbosa-Cánovas, G., Ortega-Rivas, E., Juliano, P. y Yan, H. (2005). *Food Powders*. Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- Bustos, M. C., Pérez, G. T. y León, A. E. (2011). Effect of four types of dietary fiber on the technological quality of pasta. *Food Science and Technology International*, 17(3), 213–219. <https://doi.org/10.1177/1082013210382303>
- Cauvain, S. P. (2012). *Breadmaking, Improving quality* (Second edd). New Delhi, India: Woodhead Publishing.
- Codex Alimentarius. (2001). *Fats, oils and related products (2nd ed.)*. Rome, Italy: FAO/WHO Food Standards Programme.
- Davidov-Pardo, G., Rocchia, P., Salgado, D., León, A. E. y Pedroza-Islas, R. (2008). Utilization of different wall materials to microencapsulate fish oil. Evaluation of its behavior in bread products. *American Journal of Food Technology*, 3(6), 384–393.
- Gallardo, G., Guida, L., Martinez, V., López, M. C., Bernhardt, D., Blasco, R., Hermida, L. G. (2013a). Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. *Food Research International*, 52(2), 473–482. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.020>
- Ganesan, B., Brotherson, C. y McMahon, D. J. (2014). Fortification of foods with omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(1), 98–114. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.578221>
- Gökmen, V., Mogol, B. A., Lumaga, R. B., Fogliano, V., Kaplun, Z. y Shimoni, E. (2011). Development of functional bread containing nanoencapsulated omega-3 fatty acids. *Journal of Food Engineering*, 105(4), 585–591. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.03.021>
- Gonzalez, A., Bordón, M.G., Bustos, M.C., Córdova Salazar, K.L., Ribotta, P.D. y Martinez, M.L. (2020). Study of the incorporation of native and microencapsulated chia seed oil on pasta properties. *International Journal of Food Science & Technology*. doi:10.1111/ijfs.14623
- González, A., Martínez, M. L., León, E. y Ribotta, P. D. (2018). Effects on bread and oil quality after functionalization with microencapsulated chia oil. *J Sci Food Agric*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9022>
- González, A., Martínez, M. L., Paredes, A. J., León, A. E. y Ribotta, P. D. (2016). Study of the preparation process and variation of wall components in chia (*Salvia hispanica* L.) oil microencapsulation. *Powder Technology*, 301, 868–875. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2016.07.026>
- Hermida, L. G. y Gallardo, G. (2015). *Food Applications of Microencapsulated Omega-3 Oils*.

- Microencapsulation and Microspheres for Food Applications* (Vol. 3). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800350-3.00018-2>
- International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (ISSFAL). (2004). Report of the Sub-Committee on Recommendations for the intake of polyunsaturated fatty acids in healthy adults. <https://www.issfal.org/pufa-recommendations> (último acceso 16 Octubre 2020).
- Martinez, M. L. (2010). *Extracción y caracterización de aceite de nuez (Juglans regia L.): influencia del cultivar y de factores tecnológicos sobre su composición y estabilidad oxidativa*.
- Martinez, M. L., Marín, M. A., Faller, C. M. S., Revol, J., Penci, M. C. y Ribotta, P. D. (2012). Chia (*Salvia hispanica* L.) oil extraction: study of processing parameters. *Food Sci. Tech.*, 47(1), 78–82.
- Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L. y Montonati, M. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *DIAETA*, 25(121), 20–33.
- Pareyt, B., Finnie, S. M., Putseys, J. A. y Delcour, J. A. (2011). Lipids in bread making: Sources, interactions, and impact on bread quality. *Journal of Cereal Science*, 54(3), 266–279.
- Pharmacopeia. (2000). *National formulary (USP 24 NF 19)*. MD, US: Rockville.
- Plemmons, L. E. y Resurreccion, A. V. A. (1998). A warm-up sample improves reliability of responses in descriptive analysis. *Journal of Sensory Studies*, 13, 359–376.
- Ribotta, P. D., Pérez, G. T., Añón, M. C. y León, A. E. (2001). Relationships between Different Hydration Properties of Commercial and Laboratory Soybean Isolates. *Scanning Electron Microscopy*, 0, 4852–4858.
- Simopoulos, A. P. (2011). Evolutionary Aspects of Diet: The Omega-6 / Omega-3 Ratio and the Brain. *Molecular Neurobiology*, 44, 203–215. <https://doi.org/10.1007/s12035-010-8162-0>
- Sousdaleff, M., Baesso, M. L., Neto, A. M., Nogueira, A. C., Marcolino, V. A. y Matioli, G. (2013). Microencapsulation by freeze-drying of potassium norbixin and curcumin with maltodextrin: stability, solubility and food applications. *J. Agric. Food Chem*, 61(4), 955–965.
- Sozer, N. y Kokini, J. L. (2009). Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in Biotechnology*, 27(2), 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.10.010>
- Steffolani, M. E., Ribotta, P. D., Pérez, G. T. y León, A. E. (2010). Effect of glucose oxidase, transglutaminase, and pentosanase on wheat proteins: Relationship with dough properties and bread-making quality. *Journal of Cereal Science*, 51(3), 366–373. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.01.010>
- Tudorică, C.M., Kuri, V. y Brennan, C. (2002). Nutritional and physicochemical characteristics of dietary fiber enriched pasta. *J. of Agric. and Food Chem.*, 50, 347-356.
- Trumbo, P., Schlicker, S., Yates, A.A., & Poos, M. (2002). Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *Journal of the American Dietetic Association*, 102 (11), 1621-1630.
- Zhang, Y., Tan, C., Abbas, S., Eric, K., Zhang, X., Xia, S. y Jia, C. (2014). The effect of soy protein structural modification on emulsion properties and oxidative stability of fish oil microcapsules. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 120, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.006>